

ZUR
AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHEN
REINIGUNG
VON ANTI-SOJAPROTEIN-SEREN

Anton Puff

Disbui. München

1989

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs
Komm. Leitung: Prof. Dr.Dr.h.c. L. Kotter
Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr.Dr.habil. Ch. Ring
und dem Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Ernährungsphysiologie
Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

ZUR AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHEN REINIGUNG
VON ANTI-SOJAPROTEIN-SEREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anton Puff
aus
Vohenstrauß

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr.Dr.habil. Ch. Ring

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Ruf

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Verzeichnis der Kapitel

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
3	Methodik der Befragung	3
4	Statistische Verfahren zur Datenanalyse	4
5	Erhebung der Daten	5
6	Statistische Verfahren	6
7	Erhebung der Daten	7
8	Statistische Verfahren	8
9	Erhebung der Daten	9
10	Statistische Verfahren	10
11	Erhebung der Daten	11
12	Statistische Verfahren	12
13	Erhebung der Daten	13
14	Statistische Verfahren	14
15	Erhebung der Daten	15
16	Statistische Verfahren	16
17	Erhebung der Daten	17
18	Statistische Verfahren	18
19	Erhebung der Daten	19
20	Statistische Verfahren	20
21	Erhebung der Daten	21
22	Statistische Verfahren	22
23	Erhebung der Daten	23
24	Statistische Verfahren	24
25	Erhebung der Daten	25
26	Statistische Verfahren	26
27	Erhebung der Daten	27
28	Statistische Verfahren	28
29	Erhebung der Daten	29
30	Statistische Verfahren	30
31	Erhebung der Daten	31
32	Statistische Verfahren	32
33	Erhebung der Daten	33
34	Statistische Verfahren	34
35	Erhebung der Daten	35
36	Statistische Verfahren	36
37	Erhebung der Daten	37
38	Statistische Verfahren	38
39	Erhebung der Daten	39
40	Statistische Verfahren	40
41	Erhebung der Daten	41
42	Statistische Verfahren	42
43	Erhebung der Daten	43
44	Statistische Verfahren	44
45	Erhebung der Daten	45
46	Statistische Verfahren	46
47	Erhebung der Daten	47
48	Statistische Verfahren	48
49	Erhebung der Daten	49
50	Statistische Verfahren	50
51	Erhebung der Daten	51
52	Statistische Verfahren	52
53	Erhebung der Daten	53
54	Statistische Verfahren	54
55	Erhebung der Daten	55
56	Statistische Verfahren	56
57	Erhebung der Daten	57
58	Statistische Verfahren	58
59	Erhebung der Daten	59
60	Statistische Verfahren	60
61	Erhebung der Daten	61
62	Statistische Verfahren	62
63	Erhebung der Daten	63
64	Statistische Verfahren	64
65	Erhebung der Daten	65
66	Statistische Verfahren	66
67	Erhebung der Daten	67
68	Statistische Verfahren	68
69	Erhebung der Daten	69
70	Statistische Verfahren	70
71	Erhebung der Daten	71
72	Statistische Verfahren	72
73	Erhebung der Daten	73
74	Statistische Verfahren	74
75	Erhebung der Daten	75
76	Statistische Verfahren	76
77	Erhebung der Daten	77
78	Statistische Verfahren	78
79	Erhebung der Daten	79
80	Statistische Verfahren	80
81	Erhebung der Daten	81
82	Statistische Verfahren	82
83	Erhebung der Daten	83
84	Statistische Verfahren	84
85	Erhebung der Daten	85
86	Statistische Verfahren	86
87	Erhebung der Daten	87
88	Statistische Verfahren	88
89	Erhebung der Daten	89
90	Statistische Verfahren	90
91	Erhebung der Daten	91
92	Statistische Verfahren	92
93	Erhebung der Daten	93
94	Statistische Verfahren	94
95	Erhebung der Daten	95
96	Statistische Verfahren	96
97	Erhebung der Daten	97
98	Statistische Verfahren	98
99	Erhebung der Daten	99
100	Statistische Verfahren	100

Meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0018

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	3
2.1 Bedeutung der Sojabohne	3
2.2 Handelsformen von Sojaprodukten	4
2.2.1 Sojamehl und Sojagrieß	4
2.2.2 Sojaproteinkonzentrat	4
2.2.3 Sojaproteinisolat	5
2.2.4 Texturiertes Sojaprotein	5
2.3 Eigenschaften von reinem Sojaeiweiß	6
2.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften	6
2.3.2 Technologische Eigenschaften	7
2.4 Zum Einsatz von Sojaproteinprodukten	8
2.5 Rechtliche Regelungen für Sojaproteinzu- sätze zu Fleisch-Erzeugnissen	9
2.6 Nachweisverfahren für Fremdeiweiße unter be- sonderer Berücksichtigung des Sojaproteins	10
2.6.1 Mikroskopische und histologische Methoden	11
2.6.2 Elektrophoretische Methoden	11
2.6.3 Immunologische Methoden	13
2.6.3.1 Präzipitation	14
2.6.3.1.1 Ringtest	14
2.6.3.1.2 Agar-Gel-Diffusionstest	15
2.6.3.1.3 Immunelektrophorese	16
2.6.3.1.4 Immunfluoreszenz	16

	Seite
2.6.3.2 Agglutination	17
2.6.3.2.1 Indirekte Hämagglutination	17
2.6.3.2.2 Radio-Immuno-Assay (RIA)	18
2.6.3.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	19
2.6.4 Sonstige Nachweisverfahren	21
2.6.4.1 Aminosäuren- und Peptidbestimmungen	21
2.6.4.2 Nachweis über Begleitstoffe	22
 2.7 Kreuzreaktionen	 23
2.7.1 Immunologische Grundlagen	23
2.7.2 Lebensmittelserologie	23
2.7.3 Verbesserung der Serumspezifität	24
2.7.3.1 Absorption und andere Reinigungsverfahren	24
2.7.3.2 Affinitätschromatographie	25
 3 MATERIAL UND METHODEN	 27
3.1 Gewinnung von Antiseren	27
3.2 Reinigung der Antiseren	28
3.2.1 Vorbereitung des Gels	28
3.2.1.1 Material	28
3.2.1.2 Methode	29
3.2.2 Durchführung der Reinigung	30
3.2.2.1 Versuche mit der Kapillarsäule	30
3.2.2.1.1 Material	30
3.2.2.1.2 Methode	30
3.2.2.2 Versuche mit der Säule C26/40	31
3.2.2.2.1 Material	31
3.2.2.2.2 Methode	31

	Seite
3.3	Einengung des Eluates 33
3.4	Vergleichende Prüfung der Antigenspezifität von Antiserum und Eluat 33
3.4.1	Proteinbestimmung 33
3.4.2	Titerbestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 33
3.4.2.1	Material 33
3.4.2.2	Methode 35
3.4.3	Quantitativer Sojaproteinnachweis in Modellwürsten mittels ELISA 36
3.4.4	Indirekte Hämagglutination (IH) 38
4	ERGEBNISSE 39
4.1	Ergebnisse der affinitätschromatographischen Reinigung der selbstgewonnenen Anti-Sojaprotein-Seren 40
4.1.1	Ergebnisse mittels Kapillarsäule 40
4.1.1.1	Untersuchung verschiedener Serummengen 40
4.1.1.1.1	Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte 40
4.1.1.1.2	Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute 43
4.1.1.2	Untersuchung verschieden starker Gel-Beschichtungen 46
4.1.1.2.1	Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte 46
4.1.1.2.2	Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute 49
4.1.2	Ergebnisse der Reinigung mittels der Chromatographie-Säule C26/40 52
4.1.2.1	Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte 52
4.1.2.2	Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute 55

		Seite
4.2	Ergebnisse der Reinigung eines kommerziellen Anti-Sojaprotein-Serums	58
4.2.1	Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte	58
4.2.2	Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute	59
4.3	Ergebnisse der Messung mittels Indirekter Hämagglutination (IH)	60
4.4	Quantitativer Sojaproteinnachweis in Fleisch-Erzeugnissen mittels ELISA	61
4.4.1	Nachweis in auf 72 °C erhitzten Brühwürsten	61
4.4.2	Nachweis in auf 116 °C erhitzten Dosenwürsten	63
4.4.3	Prüfung der Antigenspezifität des Eluates beim Fremdeiweißnachweis in Brühwürsten	65
5	DISKUSSION	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	SUMMARY	82
8	TABELLEN	84
9	LITERATURVERZEICHNIS	117

1 EINLEITUNG

In der Bundesrepublik Deutschland ist der Zusatz von Sojaprotein zu Fleisch-Erzeugnissen und der Import von Fleischwaren mit Sojaproteinzusätzen gegenwärtig rechtlich unzulässig. Demgegenüber ist in einigen Mitgliedstaaten der Europäischen Gemeinschaft (z.B. Frankreich) der Einsatz von Sojaproteinen bei der Fleischverarbeitung erlaubt. Das deutsche Importverbot für Fleisch-Erzeugnisse mit Sojaproteinzusätzen wird in diesen Ländern als Handelshemmnis im Sinne des Art. 30 des EWG-Vertrages von Rom angesehen. Nachdem der Europäische Gerichtshof in ähnlichen Verfahren meist den Klagen recht gab und z.B. zuletzt am 12.3.1987 in der Rechtssache 178/84 "Vertragsverletzung - Reinheitsgebot für Bier" (ZLR 14 [1987], 326) zugunsten der EG-Kommission, d.h. gegen den ausschließlichen Vertrieb von "reinem" Bier in der Bundesrepublik Deutschland, entschied, ist davon auszugehen, daß im Falle eines Rechtsstreites das Importverbot für Fleischwaren mit Sojaproteinzusätzen ebenfalls für unzulässig erklärt würde. Darüber hinaus steht zu erwarten, daß gerade auch im Zuge der Vollendung eines europäischen Binnenmarktes bis 1992 weitere auf nationalem Recht beruhende Handelsschranken fallen werden und somit auch Fleisch-Erzeugnisse mit Zusätzen an Sojaprotein und anderen pflanzlichen Eiweißen in der Bundesrepublik Deutschland produziert oder dorthin eingeführt werden dürfen.

Es ist daher erforderlich, vorsorglich zuverlässige und hinreichend sensitive Methoden zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in erhitzten wie auch hochoerhitzten Fleisch-Erzeugnissen verfügbar zu haben. Dabei zeichnen sich lebensmittelserologische Verfahren zwar selbst in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen noch durch eine vergleichsweise hohe Empfindlichkeit aus, ihre Aussagekraft wird aber durch die Neigung der Antiseren, unspezifische Reaktionen (Kreuzreaktionen) einzugehen, eingeschränkt.



Zur weitgehend umfassenden Einschränkung dieser Kreuzreaktionen bietet sich gegenwärtig die Affinitätschromatographie an, ein Verfahren, das in vielen Bereichen der Biochemie in den letzten zwanzig Jahren eine weite Verbreitung gefunden hat. Sie wird in diesen Bereichen unter Ausnutzung der biospezifischen Bindungseigenschaften der Proteine dazu benutzt, die verschiedensten Biomoleküle aus Gemischen zu isolieren und in reiner Form zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geprüft werden, inwieweit die Affinitätschromatographie auch in der Lebensmittelserologie zur Reinigung von Anti-Sojaprotein-Seren verwendet werden kann. Die Prüfung der Wirksamkeit soll dabei mit bewährten serologischen Methoden, vor allem dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (z.B. HITCHCOCK et al., 1981; MARTLBAUER und TERPLAN, 1985; RING, 1987), erfolgen.

2 LITERATUR

2.1 Bedeutung der Sojabohne

Die Sojabohne, *Glycine max* bzw. Soja max, ist ein Schmetterlingsblütler aus der Familie der Leguminosen und als alte Kulturpflanze bekannt, die in China zur Zeit der Shang-Dynastie um 1700-1100 v. Chr. domestiziert wurde und sich von dort über den südost-asiatischen Raum bis nach Südost-Europa und in die Sowjetunion ausbreitete. Mitte des 19. Jahrhunderts fand die Sojabohne auch vereinzelt in Westeuropa und vermehrt in den USA Verbreitung. Zwischenzeitlich erstreckt sich ihr Anbaugebiet vom 50. Grad nördlicher bis zum 40. Grad südlicher Breite (CHU, 1981; HAHNEL, 1984; MANSFELD, 1986). Einen sprunghaften Anstieg erlebte die Sojabohnenproduktion allerdings erst in jüngster Zeit, wobei die USA mit etwa 60 % der Weltproduktion (1986: 54,6 Mill. t von 95 Mill. t) das weitaus bedeutendste Erzeugerland sind (FAO, 1987).

Die Sojabohne ist einer der wichtigsten pflanzlichen Protein-träger. Sie enthält neben 18-25 % Öl, 17-32 % Kohlenhydraten und mehreren Mineralstoffen auch 38-50 % Eiweiß. Dieses Eiweiß zählt zu den hochwertigsten im Pflanzenreich, da es fast alle essentiellen Aminosäuren in ausreichender Menge enthält.

Während im asiatischen Raum die Sojabohne in den verschiedensten Zubereitungsarten hauptsächlich der menschlichen Ernährung dient, wird sie in den westlichen Ländern vor allem zur Ölgewinnung genutzt. Die verbleibenden proteinreichen Anteile der Frucht finden als hochwertiges Kraftfuttermittel in der Tierernährung Verwendung, z.B. als Sojaschrot. Für die menschliche Ernährung spielen die Sojaproteinprodukte mit etwa 3 % Anteil an der Gesamtproduktion noch eine untergeordnete Rolle, die Zuwachsraten auf diesem Sektor sind in jüngster Zeit allerdings beachtlich (HORAN, 1974; KINSELLA, 1979).

Industriell finden Sojabohnen und -produkte Verwendung in der Ernährungswirtschaft, bei der Herstellung z.B. von Klebstoffen, synthetischen Fasern, Imprägnierungen und Feuerlöscherschaum (HÄHNEL, 1984; MANSFELD, 1986).

2.2 Handelsformen von Sojaprodukten

2.2.1 Sojamehl und Sojagrieß

Sojamehl und Sojagrieß werden aus gemahlenen und entfetteten Sojaflocken hergestellt. Sie unterscheiden sich nur in der Körnchengröße, wobei Sojamehl das feinere (Siebgröße < 100) und Sojagrieß das gröbere (Siebgröße > 100) Produkt ist.

Sojamehl und -grieß enthalten etwa 50 % Protein und ca. 30 % Kohlenhydrate, der Fettanteil schwankt je nach Produkt zwischen 1 % (= entfettet) und 20 % (= vollfett) (siehe Tab. 1).

2.2.2 Sojaproteinkonzentrat

Sojaproteinkonzentrate, die mindestens 70 % Protein enthalten müssen, werden mittels unterschiedlicher Verfahren hergestellt. Aus nativen entfetteten Flocken werden die löslichen Komponenten - Kohlenhydrate, Peptide, Asche - entweder mit 60-80 %igem Alkohol oder mit angesäuertem Wasser (pH 4,5) ausgewaschen. Bei hitzebehandelten Ausgangsprodukten genügt es, die Nichtprotein-Verbindungen mit Wasser zu extrahieren (RAKOSKY, 1970; OHREN, 1981) (siehe Tab. 1).

2.2.3 Sojaproteinisolat

Sojaproteinisolate, die mindestens 90 % Protein in der Trockenmasse enthalten sollen, werden aus entfetteten, schwach erhitzten Sojamehlen hergestellt. Dabei wird das Protein zunächst in einem schwach alkalischen Medium gelöst, danach gefiltert und anschließend am isoelektrischen Punkt (pH 4,5) ausgefällt. Der gewonnene Proteinbrei wird entweder sofort getrocknet oder zuvor mit NaOH neutralisiert und als wasserlösliches Na-Proteinat verwendet (RAKOSKY, 1970; KINSELLA, 1979; OHREN, 1981) (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von Sojaprotein-Produkten (in %) (KINSELLA, 1979)

Bestandteil	Sojamehl	Konzentrat	Isolat
Protein	56,0	72,0	96,0
Fett	1,0	1,0	0,1
Kohlenhydrate	33,5	17,5	0,3
Rohfaser	3,5	4,5	0,1
Asche	6,0	5,0	3,5

2.2.4 Texturiertes Sojaprotein

Texturiertes Sojaprotein (TSP) wird aus Sojamehl oder -konzentrat durch thermoplastische Extrusion hergestellt und getrocknet. Im Falle der Anwendung kann ein mehrfaches des Eigengewichtes an Wasser gebunden werden. Darüber hinaus kann Sojaisolat, das - in alkalischem Milieu gelöst - durch Spinn-düsen gepreßt und in einem Säurebad ausgefällt wird, zu verschiedenen Produkten "verleimt" werden. Dieses TSP kommt zu-meist als Fleischersatz in gefrorenem Zustand in den Handel (CAMPBELL, 1981).

2.3 **Eigenschaften von reinem Sojaweiß**

2.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Der Proteinanteil der Sojabohne besteht aus vier Fraktionen, wobei die Speicherglobuline der 7S- und der 11S-Fraktion mit etwa 80 % den Hauptanteil bilden (KINSELLA, 1979).

Tab. 2: Durchschnittliche Verteilung der Hauptkomponenten von Sojaprotein (nach WOLF, 1970; KINSELLA, 1979)

Fraktion	Anteil (%)	Zusammensetzung	Molekulargewicht
2S	8-22	Trypsininhibitoren	8-21000
		Cytochrome	12000
		Globuline	18-32000
7S	35-37	Globuline	180-210000
		Lipoxygenase	108000
		β -Amylase	61700
		Hämagglutinine	110000
11S	31-52	Globuline	350000
15S	5-11	Polymere	600000

Die große Schwankungsbreite der %-Angaben ist darauf zurückzuführen, daß sich aufgrund der Assoziations-Dissoziations-Reaktionen der Globuline unter verschiedenen Bedingungen die Anteile nicht klar abgrenzen lassen.

Während die 7S- (Conglycinin) und 11S-Globuline (Glycinin) in Proteinprodukten erwünscht sind, müssen die Trypsininhibitoren, die zu Verdauungsschwierigkeiten führen können, z.B. durch Erhitzung inaktiviert werden (KINSELLA, 1979).

Ursache der hohen physiologischen Wertigkeit des Sojaproteins ist seine günstige Aminosäurezusammensetzung, da - mit Aus-

nahme von Methionin und Cystin - alle essentiellen Aminosäuren in mehr als ausreichender Menge vorliegen. Nach WOLF (1972) ist Sojaprotein wegen des hohen Lysinanteils eine ideale Ergänzung zu Getreideproteinen, die Lysin als limitierende Aminosäure enthalten.

Die Löslichkeit der Proteine ist nach WOLF (1972) im alkalischen Bereich und im stark sauren Bereich sehr gut. Demgegenüber sind Sojaproteine um den isoelektrischen Punkt (= pH 4,5) zwischen pH 3,5 und 5,5 nahezu unlöslich. Die Löslichkeit der Proteinisolate variiert je nach Herstellungsart von 37 bis 73 %, sie kann aber durch einen Zusatz von 0,01 M Mercaptoethanol zum Lösungspuffer auf 66-78 % verbessert werden.

Starke Hitzeeinwirkung führt zum Verlust der Extrahierbarkeit von Proteinen. WOLF (1972) berichtet, daß die Extrahierbarkeit schon durch eine zehnminütige Dampferhitzung von Sojamehl infolge der Koagulation der Proteine von 80 auf 20 % herabgesetzt wird. Deshalb wird Sojamehl, das zur Gewinnung von Isolat bestimmt ist, auch nur schwach erhitzt.

2.3.2 Technologische Eigenschaften

Sojaproteinprodukte werden vor allem in der Fleischwarenindustrie wegen ihrer positiven Eigenschaften als Hilfs- und Zusatzstoffe geschätzt.

Sie bewirken bei Brüh- und Kochwürsten eine Emulgierung von Fetten und eine erhöhte Wasseradsorption und führen durch Bindung von freiem Wasser zu einer Erhöhung der Ionenkonzentration im Lösungsraum. Außerdem unterstützen die Sojaproteine das fibrilläre Muskelprotein aktiv beim Einschluß von Fett und Wasser sowie bei der Kopplung größerer Fleisch- und Fettpartikel, was eine deutliche Verringerung des Gelee- und Fettabsatzes zur Folge hat (KOTTER et al., 1968; JUL, 1979). Neben den oben erwähnten Eigenschaften besitzen Sojaproteine

noch eine Reihe weiterer Vorzüge, die eine breite Palette von Einsatzmöglichkeiten erschließen. Besonders ihre Löslichkeit, ihre Elastizität und Viskosität, die Fähigkeit zur Geruchsbindung, Schaumbildung und nicht zuletzt zur Strukturgebung machen Sojaproteine und daraus hergestellte Produkte zu einem weitverbreiteten Hilfsmittel auf verschiedenen Gebieten der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung (KINSELLA, 1979; OHREN, 1981).

2.4 Zum Einsatz von Sojaproteinprodukten

In der fleischverarbeitenden Industrie werden Sojaproteine gegenwärtig vor allem im englischen Sprachraum, insbesondere in den USA, in prozentual hohen Anteilen als Zusatzstoffe eingesetzt. Dabei kommen hauptsächlich Konzentrate und Isolate zum Einsatz, die neben der in 2.3.2 bereits erwähnten Verwendung als Kutterhilfsmittel bei Koch- und Brühwürsten insbesondere auch als Ersatz für Fleisch-Eiweiß dienen. NOWACKI (1979) und WAGGLE et al. (1981) beschreiben in diesem Sinne ein Verfahren aus dem Bereich der Pökeltechnik, bei dem mittels einer Stechpumpe eine Sojaisolat-Salz-Polyphosphat-Lösung in große Fleischscheiben injiziert wird, um die Wasserbindungskapazität um bis zu 35 % zu erhöhen. Dieses "augmented or diluted meat" (NOWACKI, 1979) kann in ganzen Stücken (Braten, Schnitzel), als Gulasch oder für Hackfleischprodukte verwendet werden.

Außer bei Fleisch-Erzeugnissen finden Sojaproteinprodukte auch bei der Herstellung von Brot- und Backwaren in gleicher Weise Verwendung wie als Zusätze zu Milchprodukten (Kaffee-weißer, Schlagsahne), zu Getränken, Suppen, Süßigkeiten (Konfekt), Kindernahrung (Milchaustauscher) sowie als Diät-nahrung (CIRCLE, 1974; CLAUS, 1974; LEVINSON and LEMANCIK, 1974).

2.5 **Rechtliche Regelungen für Sojaproteinzusätze zu Fleisch-Erzeugnissen**

Die Bestimmungen über den Zusatz von Soja- und anderen Pflanzenproteinen zu Fleisch-Erzeugnissen sind in Europa in den einzelnen Ländern sehr unterschiedlich geregelt. In der Bundesrepublik Deutschland ist es ausdrücklich verboten, Fleisch-Erzeugnisse in Verkehr zu bringen, denen u.a. "... eiweiß-, stärke- oder dextrinhaltige Stoffe pflanzlicher Herkunft ..." zugesetzt sind (§ 4 (1), 5 FlVO). Nach Anlage 2, Nr. 6 der FlVO sind zu bestimmten Brühwurst- und Kochwurstserzeugnissen sowie zu regionalen Produkten wie Pfälzer Saumagen, Fränkische Krautleberwurst und Kartoffelwurst zwar z.B. Gurken, Karotten, hartgekochte Eier, Stärke und Teigwaren als spezielle Zutaten erlaubt, allerdings mit "Ausnahme von Soja und Soja-Erzeugnissen". In Österreich, Italien, Finnland, Luxemburg, den Niederlanden und in der Schweiz gelten Pflanzenproteine deshalb als verboten, weil sie nicht in der Liste der erlaubten Zutaten aufgeführt sind. In den anderen Ländern Europas werden die Pflanzenproteine wie andere Zusatzstoffe behandelt, sie unterliegen hier den allgemeinen Mengen- und Kennzeichnungsvorschriften, wobei sie in Norwegen mindestens 85 % Protein enthalten müssen und in Frankreich nur Proteinkonzentrate oder -isolate in Pulverform zugelassen sind (BRINCKER, 1979).

Um die Gesetzgebung über den Einsatz von Pflanzenproteinen in Fleisch-Erzeugnissen innerhalb der EG zu harmonisieren, wurde von einer Expertengruppe auf Veranlassung der Kommission der Europäischen Gemeinschaften ein Entwurf vorgelegt, der den Zusatz von Sojaprotein als technologisches Hilfsmittel im gleichen Umfang wie bei anderen Zusatzstoffen erlaubt und beim Einsatz als Fleischersatz eine Beschränkung auf 30-50 % vorsieht (BRINCKER, 1979). Diese Vorschläge stießen bei SCHUTTE (1979) auf Kritik. Aus Gründen der Praxisnähe sollte danach die Zulassung als Hilfsmittel auf 3 % statt der sonst üblichen 2 % angehoben werden. Ebenso sei die beabsichtigte

Beschränkung beim Ersatz von Fleisch und Fleischprodukten auf 30 % Sojaprotein willkürlich und veraltet, statt dessen plädiert er für eine Obergrenze von 50 %. Als einen wichtigen Punkt sieht SCHUTTE (1979) in Übereinstimmung mit der EG-Kommission eine klare Kennzeichnungspflicht an, die - wie auch VANDERVEEN (1981) bekräftigt - durch eine übersichtliche Angabe über alle Zusätze und ihre Menge den Verbraucher informiert und ihm dann die Kaufentscheidung überläßt.

2.6 **Nachweisverfahren für Fremdeiweiße unter besonderer Berücksichtigung des Sojaproteins**

Mit zunehmendem Sojaproteinangebot sind vor allem seit 1960 auch zahlreiche Verfahren zum Nachweis von Sojaprotein wie von anderen Fremdeiweißen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs - insbesondere in Fleisch-Erzeugnissen - beschrieben und diskutiert worden. Diese Methoden lassen sich nach OLSMAN und HITCHCOCK (1980) in vier Gruppen einteilen:

- Mikroskopische Methoden
- Elektrophoretische Methoden
- Immunologische Methoden
- Sonstige Methoden

Einen Überblick über das breite Spektrum der vorliegenden Nachweisverfahren vermitteln die Arbeiten von OLSMAN und KROL (1978), OLSMAN (1979), OLSMAN und HITCHCOCK (1980), ELDRIDGE (1981) und LLEWELLYN (1982).

2.6.1 Mikroskopische und histologische Methoden

MIERMEISTER beschreibt bereits 1942 den Nachweis von Sojamehl in Wurstwaren durch die Bestimmung der sanduhrförmigen Trägerzellen der Sojabohne, während CZAJA (1965) Sojamehl polarisationsmikroskopisch über das Vorhandensein von Ca-Oxalat-Kristallen, die in den Kotyledonenzellen der Sojabohne vorkommen, ermittelt.

Über erfolgreiche Versuche zum Nachweis mittels Färbung von Präparaten berichten u.a. LINKE (1969), der geformtes Sojaeiweiß (TVP) in Fleisch-Erzeugnissen durch eine Kombinationsfärbung nach Bauer und Calleja nachweist, COOMARASWAMY und FLINT (1973), die PAS-(Perjodsäure-Schiff-)Reagens zum Auffinden der Kohlenhydrate der Sojaproteinprodukte verwenden, FLINT und MEECH (1978), die mit Toluidinblau texturiertes Sojaprotein (TSP) sowohl in rohen als auch in erhitzten Fleischprodukten nachweisen und PARISI et al. (1974), die angeben, sogar Konzentrate und Isolate mittels PAS-Reagens nachweisen zu können.

Die o.a. histologischen Methoden sind vor allem qualitative und zum Teil aber auch semiquantitative Nachweisverfahren für Sojamehl und texturiertes Sojamehl (TVP). Ein Nachweis von Sojakonzentrat und -isolat ist mit diesen Verfahren allerdings nicht möglich.

2.6.2 Elektrophoretische Methoden

Die Elektrophorese, bei der die Proteine unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes entsprechend ihren Ladungen getrennt werden, ist ein Verfahren, das in verschiedenen Modifikationen zur Anwendung kommt und gute Ergebnisse liefert.

OLSMAN (1969) gelingt als erstem mit einer Harnstoff-Stärkegel-Elektrophorese der qualitative Nachweis von bis zu 0,25 %

Milchweiß bzw. 0,5 % Sojaprotein in auf 115 °C erhitzten Brühwürsten und auf 105 °C erhitzter Leberpastete.

Als Medium der Wahl setzte sich aber Polyacrylamidgel durch, mit dem FISCHER und BELITZ (1971; 1976) in auf 116 °C erhitzter Brühwurst zwei spezifische Sojaproteinbanden nachweisen können.

Als problematisch für die Elektrophorese erweist sich häufig die Extraktion und Lösung der durch die Hitze zumeist weitgehend denaturierten Proteine. PARSONS und LAWRIE gelingt 1972 nach Extraktion mit konzentrierter Harnstofflösung, die eine Auflösung der H-Brücken und der hydrophoben Bindungen bewirkt, und Mercaptoethanol, das die Disulfidbindungen spaltet, die Identifizierung spezifischer Banden für Fleisch und Sojaprotein in rohen und auf 100 °C erhitzten Produkten. Nach eigenen Angaben können sie mittels densitometrischer Messung der Flächen sogar eine quantitative Bestimmung vornehmen. Auch GUY et al. (1973) berichten über quantitative Nachweise von Sojaprotein in Fleischprodukten nach der Extraktion mit verschiedenen stark konzentrierten Lösungen von Harnstoff und Mercaptoethanol. Als untere Nachweisgrenze für Sojaisolate werden dabei 0,2 % angegeben.

HOFFMANN und PENNY (1971; 1973) stellen als weitere Möglichkeit zur Extraktion das SDS (Natriumdodecylsulfat) vor. SDS ist ein Detergenz, das schon in geringen Konzentrationen denaturierend wirkt. Es bewirkt darüber hinaus eine Änderung des elektrophoretischen Verhaltens der Proteine, da die negativ geladenen Dodecylsulfat-Ionen die Proteine umhüllen, so daß diese, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung, im elektrischen Feld ausschließlich zur Anode wandern. LEE et al. (1975; 1976) berichten, daß ihnen mit einem Tris-HCl-Puffer mit 3 % SDS- und 1 % Mercaptoethanol-Zusatz die Extraktion von 95 % des Ausgangsproteingehaltes gelang. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) können sie - ihrer Beschreibung nach - anhand von 4-5 spezi-

fischen Sojaprotein-Banden Sojaprotein in Fleisch-Erzeugnissen qualitativ und durch densitrometrische Auswertung der Fläche - mit einer Genauigkeit von $\pm 2\%$ - auch quantitativ nachweisen.

RING et al. (1982) weisen mit der Diskontinuierlichen-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Disk-PAAGE) aufgeschlossenes Milcheiweiß, Hühnereiklar und Sojaeiweiß in auf 70 °C erhitzten Brühwürsten ab einer Konzentration von 0,5 % qualitativ nach. In Würsten, die auf 120 °C erhitzt worden waren, können Fremdeiweißzusätze mittels Disk-PAAGE nicht mehr nachgewiesen werden.

HEINERT und BAUMANN (1984) können durch Einsatz eines Porositäts-Gradienten 2 Sojaprotein-Banden deutlich von den Fleisch-Banden trennen und mit ihnen Soja-Zusätze ab 1 % in Fleisch-Erzeugnissen, die für 80 min auf 110 °C erhitzt worden waren, nachweisen.

Eine Sammlung und Bewertung der verschiedenen Elektrophorese-techniken haben KAISER und KRAUSE (1985) unternommen, wobei sie der SDS-PAGE die besten Ergebnisse bescheinigen. Sie weisen aber auch darauf hin, daß gerade bei der quantitativen Sojaproteinbestimmung die Art des Sojaproduktes und die natürliche Schwankungsbreite der Proteinanteile innerhalb einer Sorte zu berücksichtigen sind, um die Meßresultate richtig einzuordnen.

2.6.3 Immunologische Methoden

Die immunologischen Verfahren beruhen durchwegs auf der spezifischen Reaktion von Antigenen mit den homologen Antikörpern, die durch verschiedene Methoden verdeutlicht werden kann. Diese Methoden lassen sich in Präzipitations- und Agglutinationsverfahren einteilen.

2.6.3.1 Präzipitation

Die Präzipitation ermöglicht durch Ausfällung der unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplexe einen qualitativen Nachweis, der im Falle optimaler Verhältnisse von Antigen- und Antikörpermenge auch semiquantitativ geführt werden kann.

2.6.3.1.1 Ringtest

Bei dieser einfachsten Form der Präzipitationsreaktionen wird das flüssige Antigen in einem Uhlenhuth-Röhrchen über das spezifische Antiserum geschichtet, wobei es - im Falle einer positiven Reaktion - an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten zur Ausbildung eines weißlichen Ringes kommt (HUMPHREY und WHITE, 1971). Der Vorteil dieses Tests ist seine leichte Handhabung und ein rasches Ergebnis. Von Nachteil ist, daß sowohl Antiserum als insbesondere auch der Antigenextrakt als klare Lösungen vorliegen müssen.

DEGENKOLB und HINGERLE (1969) weisen mittels der Röhrchenpräzipitation aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME) und Sojaprotein in auf 115 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen sowie Trockenblutplasma in Roh- und Brühwürsten quantitativ nach. KRÜGER und GROSSKLAUS (1971) beschreiben den Nachweis von Sojaprotein in auf 120 °C erhitzten Konserven bei Zusätzen ab 0,2 %. Sie bevorzugen den Ringtest vor der aufwendigeren indirekten Hämagglutination und der Immunelektrophorese. HERRMANN und KOTTER (1968) halten demgegenüber einen quantitativen Nachweis mittels Ringtest in Produkten, die höher als 70 °C erhitzt wurden, für nicht möglich.

2.6.3.1.2 Agar-Gel-Diffusionstest

Die einfache Diffusion nach OUDIN (1949), bei der das Antiserum in Agar eingebettet und die Antigenlösung darübergeschichtet wird, entwickelte OUCHTERLONY (1958; 1962) weiter zu der heute allgemein verwendeten Doppeldiffusion. Dazu werden in den Agar mehrfach rosettenförmig Löcher gestanzt, in die, getrennt voneinander, jeweils Antigenlösung und Antiserum pipettiert werden, die gegeneinander diffundieren und an der Kontaktfläche eine sichtbare, zumeist spornförmige Präzipitationslinie bilden.

Dieses Verfahren ist wesentlich empfindlicher als der Ringtest (2.6.3.1.1) und kann selbst im Falle trüber Lösungen verwendet werden. Nach HERRMANN et al. (1973; 1975) ist die Agar-Gel-Diffusion allerdings nicht für quantitative Messungen geeignet und mit zunehmender Erhitzung, der das Probenmaterial ausgesetzt war, nimmt die Möglichkeit zur Differenzierung verschiedener zugesetzter Konzentrationen ab. Darüber hinaus lassen sich prozentual geringgradige Fremdeiweißzusätze zu Fleisch-Erzeugnissen in hocheerhitzten Produkten mittels Doppeldiffusion kaum oder nicht mehr nachweisen. So konnten HERRMANN und KOTTER (1968) Trockenblutplasma in auf 70 °C erhitzten Erzeugnissen ab 0,4 %, in auf 110 °C erhitzten erst ab 8 % Zusatz nachweisen.

Anders als HERRMANN et al. (1973) behauptet GÜNTHER (1969), daß er mittels der einfachen radialen Geldiffusion nach HAYWARD und AUGUSTIN (1957) und der Doppeldiffusion nach DARCY (1960) Sojaprotein und aufgeschlossenes Milcheiweiß sowohl qualitativ als auch quantitativ ab einer Konzentration von 0,05 % nachweisen kann.

2.6.3.1.3 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde 1953 von GRABAR und WILLIAMS entwickelt und stellt eine Kombination aus Elektrophorese und Agar-Gel-Diffusion dar, bei der parallel zur Wanderrichtung der Proteine eine Rinne ins Gel gestanzt wird, die mit Antiserum gefüllt wird. Als Ausdruck der Reaktion der Antigene mit ihren spezifischen Antikörpern werden nach Anschluß an den Stromkreis entsprechend der von der Molekülgröße und der nach außen gerichteten Ladung abhängigen jeweiligen Laufgeschwindigkeit nach 1-2 Tagen die Präzipitationslinien sichtbar (HUMPHREY und WHITE, 1971).

GÜNTHER (1969) benützt die Immunelektrophorese in der Mikro-modifikation nach SCHEIDEGGER (1955) zur qualitativen Überprüfung der Agar-Gel-Doppeldiffusion. Er hält ebenso wie ENOCH (1967), HERRMANN und KOTTER (1968) und HERRMANN et al. (1973) allenfalls semiquantitative Aussagen für möglich. Auch SINELL (1968) ist der Auffassung, daß quantitative Aussagen nur annähernd zu treffen sind, wenn Vergleichslösungen vorhanden sind, die den Proben hinsichtlich Herstellung und Zusammensetzung weitgehend entsprechen.

2.6.3.1.4 Immunfluoreszenz

Bei dieser in verschiedenen Modifikationen (direkt, indirekt, Sandwichtechnik) angewandten Methode werden die fluoreszierenden Substanzen Fluoreszin-Isocyanat oder -Isothiocyanat an die spezifischen Antikörper gebunden und diese dann auf präparierte Gefrierschnitte, die das Antigen enthalten, aufgetropft. Nach etwa 30 min Einwirkzeit bei 37 °C und Abspülen der überschüssigen Antikörper mit 0,9 %iger NaCl-Lösung sind die Antigen-Antikörper-Komplexe als fluoreszierende Punkte im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen (HUMPHREY und WHITE, 1971).

Nach HERRMANN und KOTTER (1968) sind mit dieser selten an-

gewandten Methode nur qualitative Fremdeiweiß-Nachweise möglich, dann allerdings bis zu einer Temperatur von 120 °C.

2.6.3.2 Agglutination

2.6.3.2.1 Indirekte Hämagglutination

Während bei der Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplex direkt sichtbar wird, dienen bei der Indirekten Hämagglutination (IH) Erythrozyten als Indikator der Antigen-Antikörper-Reaktion, wodurch die Spezifität und Empfindlichkeit um den Faktor 10 (STAVITSKY, 1957; OLSMAN und HITCHCOCK, 1980) bis 100 (HERRMANN et al., 1975) erhöht wird und auch der Nachweis mit stark verdünnten Immunseren ermöglicht wird.

Bei dem von BOYDEN (1951) entwickelten Verfahren werden an Hammelerythrozyten, deren Oberfläche durch Tannin aufgerauht wurde, die jeweiligen Antigene adsorbiert, die bei der Zugabe der homologen Antikörper mit diesen reagieren. Diese Agglutinationsreaktion stellt sich als teppichartige Verbreitung der Erythrozyten auf dem Gläschenboden dar, während bei Ausbleiben der Reaktion die Erythrozyten am tiefsten Punkt des Gläschens sedimentieren (KOTTER und HERRMANN, 1968).

Über die Brauchbarkeit der Indirekten Hämagglutination zum Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen gehen die Ansichten weit auseinander. So gelingt es HERRMANN und KOTTER (1968), Hühnereiweiß ab 1,0 %, aufgeschlossenes Milcheiweiß ab 0,1 % und Sojaeiweiß ab 0,2 % in erhitzten Fleischwaren nachzuweisen. In Fleisch-Erzeugnissen, die auf 115 °C erhitzt wurden, gelingt KOTTER et al. (1966) der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß und WAGENSTALLER (1972) der Nachweis von Sojaprotein quantitativ ab 0,1 bzw. 0,2 %.

KLUGE-WILM (1967) kann diese Ergebnisse aufgrund ihrer Untersuchungen nicht bestätigen, sie ermittelt nur ungenaue Werte,

aus denen kein Zusammenhang mit den zugesetzten Mengen an Milcheiweiß ersichtlich ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch DEGENKOLB und HINGERLE (1969), die deshalb und auch wegen des hohen Arbeitsaufwandes Zweifel an der Genauigkeit und Anwendung der Indirekten Hämagglutination für die Routineuntersuchung äußern.

KRÜGER und GROSSKLAUS (1971) weisen in Fleisch-Erzeugnissen, die auf 75 °C erhitzt worden sind, Sojaprotein mittels der Indirekten Hämagglutination quantitativ nach. In höher erhitzten Produkten gelingt ihnen dieser Nachweis nicht mehr, und sie begründen darauf ihre Vorbehalte gegen diese Methode. Anders ENOCH (1967), die aufgrund ihrer einschlägigen Untersuchungen die Indirekte Hämagglutination für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen als Methode der Wahl empfiehlt.

RING und SACHER (1984) modifizieren die von WAGENSTALLER (1972) vorgeschlagene Indirekte Hämagglutinationsmethode zum Nachweis von Sojaprotein, zeigen mögliche Fehlerquellen im Rahmen der Durchführung der IH auf und geben detaillierte Hinweise zur Vermeidung solcher Fehler. Insgesamt kommen sie zu einer prinzipiellen Bestätigung der Ergebnisse von KOTTER et al. (1966), HERRMANN und KOTTER (1968) und WAGENSTALLER (1972).

2.6.3.2.2 Radio-Immuno-Assay (RIA)

Über den Einsatz des Radio-Immuno-Assay (RIA) zur Bestimmung von Sojaprotein liegen nur wenige Aussagen vor. Dazu zählen vor allem die Publikationen von MENZEL (1981), MENZEL und GLATZ (1981) und MENZEL und HAGEMEISTER (1982), die zwei radioimmunologische Techniken auf ihre Verwendbarkeit zur quantitativen Sojaproteinbestimmung untersuchen, den Präzipitations-RIA und den Festphasen-RIA. Dabei stellen sie fest, daß der Präzipitations-RIA bei einer Nachweisgrenze von 10 µg/ml sowohl für den Nachweis von nativem als auch hocher-

hitzem Sojaprotein geeignet ist, während mittels Festphasen-RIA lediglich der Nachweis von hochothermisiertem Sojaprotein gelingt.

2.6.3.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der 1971/72 von ENGVALL und PERLMANN und unabhängig davon zur gleichen Zeit von VAN WEEMEN und SCHUURS entwickelte Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) erfährt seither eine große Ausbreitung und wird in zahlreichen Gebieten der Forschung und Diagnose in unterschiedlichen Variationen und Modifikationen angewandt. Das Einsatzspektrum reicht dabei vom Nachweis parasitärer (WEILAND, 1978; EBERT, 1982), viraler (WIEGMANN, 1982; HAVE, 1982) und bakterieller Infektionen (CROSSON et al., 1978; HOWARD et al., 1982; DONACHIE und JONES, 1982) über den Nachweis von Antibiotika (CAMPBELL et al., 1984) bis zum Nachweis von Toxinen in Futter- und Lebensmitteln (SIMON und TERPLAN, 1977; BIERMANN und TERPLAN, 1982; MARTLBAUER und TERPLAN, 1985; RENZ und TERPLAN, 1987) sowie, in Kombination mit der HPLC, von Anabolika in Exkrementen und in Fleisch (RING, 1988).

Es kommen vor allem drei Varianten der ELISA-Technik zur Anwendung, die direkte -, indirekte - und kompetitive - bzw. Sandwich-Methode, die - je nach Anwendungsgebiet - noch weiter modifiziert werden können (VOLLER, BIDWELL und BARTLETT, 1980). Allen Verfahren gemeinsam ist das Prinzip, daß Antigene oder Antikörper mittels eines an homologe Antikörper bzw. Antigene gekoppelten Enzyms (Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase), das bei Zugabe eines Substrats einen Farbumschlag bewirkt, sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden können. Der Vorteil des ELISA gegenüber anderen Methoden liegt darin, daß er den Kriterien einfache Durchführbarkeit, Wirtschaftlichkeit, Zuverlässigkeit, hohe Empfindlichkeit und Flexibilität in weitgehend optimaler Weise gerecht wird (BURRELLS und DAWSON, 1982).

Über den Einsatz des ELISA zur Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch-Erzeugnissen berichten erstmals 1981 HITCHCOCK et al.. Sie testeten verschiedene Gruppen von kommerziellen Sojaprodukten und ermittelten dabei Wiederfindungsraten von durchschnittlich 99 % bei vollfetten Sojamehlen, 111 % bei entfetteten Mehlen, 108 % bei Isolaten und 82 % bei Konzentraten. Aufgrund ihrer Ergebnisse halten sie den ELISA für eine gut geeignete Methode, Fremdprotein-Zusätze in Fleisch-Erzeugnissen qualitativ zu charakterisieren und quantitativ einzuschätzen.

Über die Ergebnisse eines Ringversuches zum quantitativen Sojaproteinnachweis mittels ELISA im Vergleich mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese berichten OLSMAN, DOBBELAERE und HITCHCOCK (1983). Dabei hatten die beteiligten Untersuchungsstellen die Sojaproteinzusätze von je 10 Proben, die 60 min auf 80 °C erhitzt und denen Sojamehl, -konzentrat und -isolat oder texturiertes Sojamehl bzw. texturiertes Konzentrat zugesetzt worden waren, zu analysieren. Die Resultate dieser Untersuchungen lagen - obwohl neun der sechzehn teilnehmenden Institute die ELISA-Technik zum ersten Mal anwendeten - nur durchschnittlich 0,1-1,4 % über den tatsächlichen Fremdproteinzusätzen. Nach Meinung der Autoren ist das Beweis genug, die Eignung des ELISA zum quantitativen Nachweis von Sojaproteinzusätzen zu belegen. Für den Einsatz in der allgemeinen Lebensmittelüberwachungspraxis werden dabei noch weitere Verbesserungen empfohlen.

MANZ (1983, 1985) verwendet den ELISA zur Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine von entsprechenden Anteilen der Tierarten Känguruh, Rind und Schwein in Fleisch-Erzeugnissen, wobei er noch bei auf 80 °C erhitzten Produkten gute quantitative Nachweise erzielt. Demgegenüber ist bei Untersuchungsmaterial aus Fleisch-Erzeugnissen, die einer Erhitzung von 115 °C ausgesetzt waren, eine starke Vermin- derung der Antigen-Antikörper-Bindungen festzustellen.

RING (1985, 1987) stellt zwei Techniken des ELISA zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein in Fleisch-Erzeugnissen vor, die Sandwichtechnik und als Screenig-Test für die Überwachungspraxis eine Modifikation der indirekten Methode. Mit beiden Verfahren ist es ihm möglich, in Modellbrühwürsten Sojaisolatzusätze von 0,25 %, 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % quantitativ zu erfassen und zu differenzieren.

2.6.4 Sonstige Nachweisverfahren

2.6.4.1 Aminosäuren- und Peptidbestimmungen

FISCHER, BELITZ und KLOOS (1976) schlagen vor, Sojaweiß in Fleisch-Erzeugnissen mittels der freien Aminosäure Canavanin nachzuweisen, die in Sojaprodukten aller Art vorkommt. Wegen der starken Konzentrationsschwankungen dieser Aminosäure in den einzelnen Produkten ermöglicht diese Methode allerdings nur einen qualitativen Nachweis von Sojaprotein.

Mit Hilfe des Vergleiches der Aminosäurenmuster der Proteine eines zusammengesetzten Produktes mit bis zu vier Aminosäurenmustern von Vergleichsproteinen, die der Computer aus einer Reihe von Möglichkeiten selbständig auswählt, zeigen LINDQVIST et al. (1975) eine Möglichkeit auf, durch diese "multiple Regressionsanalyse" auch unbekannte Proteinzusätze zu identifizieren und quantitativ zu erfassen.

Einen anderen Weg wählt BAILEY (1976). Er erhält bei seinen Untersuchungen durch enzymatische Aufspaltung des Fleischprodukt-Extraktes lösliche Peptide. Aus diesem Peptidgemisch isoliert er durch Trennung mittels Kationenaustauscher-Säule ein für Sojaprotein spezifisches Pentapeptid, das er für den quantitativen Nachweis benutzt. Als Nachweisgrenze für dieses Verfahren gibt BAILEY den relativ großen Zusatz von 5 g Sojaprotein/100 g Gesamtprotein an mit einer Genauigkeit von $\pm 5 \%$.

Durch die Anwendung des Elektro-Blotting (Glykoprotein-Blotting) können HEINERT und BAUMANN (1986) Sojaisolat in Brühwürsten nachweisen, die für 60 min auf 120 °C hoch erhitzt worden waren. Dabei werden die Glykoproteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels PAGE auf eine immobilisierende Matrix (Nitrozellulosemembran) transferiert, mit dem Lektin Concanavalin A (Con A) und einem Markerenzym inkubiert und der Con A-Glykoprotein-Enzym-Komplex durch Substratzugabe färbend dargestellt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß die sojaspezifischen Banden nicht mehr durch fleischeigene oder andere Proteinbanden überdeckt werden.

2.6.4.2 Nachweis über Begleitstoffe

Bereits 1942 erstellt MIERMEISTER eine Arbeitsvorschrift, derzufolge eine zumindest annähernde Erfassung des Sojakeim-Masse-Gehaltes in Wurstwaren über die Bestimmung des Rohfasergehaltes als Begleitstoff ermöglicht werden soll.

ELDRIDGE et al. (1979) beschreiben Versuche, über die Ermittlung des Gesamtgehaltes an Kohlenhydraten verschiedener Sojaprodukte und daran anteiliger Zucker den Nachweis dieser Sojaprodukte in Fleisch-Erzeugnissen zu führen. OLSMAN (1979) verweist darüber hinaus auf die Bestimmung von Oligosacchariden wie Raffinose und Stachyose sowie Pentosanen, Saponinen, Phytin, Mangan und Magnesium als Möglichkeiten zum Sojaproteinnachweis.

Der Nachteil des Nachweises über Begleitstoffe liegt darin, daß diese oft auch in anderen Getreiden und Hülsenfrüchten vorkommen und ihr Anteil schon innerhalb eines Produktes hohen Schwankungen unterliegt. Außerdem werden sie bei der Herstellung von Produkten wie Sojakonzentraten und -isolaten fast vollständig eliminiert.

Eine Möglichkeit zur zuverlässigen Bestimmung von Sojaisolat-

zusätzen bietet der in den USA gesetzlich vorgeschriebene, in Europa aber verbotene Zusatz von Titaniumperoxid in einer Menge von 0,1 % zu Sojaproteinisolaten. Dabei wird der quantitative Sojaproteinnachweis durch photometrische Bestimmung des gelben TiO_2 -Komplexes ermöglicht (RAKOSKY, 1970).

2.7 Kreuzreaktionen

2.7.1 Immunologische Grundlagen

Kreuzreaktionen treten auf, wenn Antigene mehr oder weniger zahlreiche ganz oder teilweise identische antigene Determinanten besitzen, so daß der Antikörper sich mit mehr oder weniger großen Teilen der Determinante verbinden kann. Auch die Avidität, d.h. die Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung, hat Einfluß auf die Ausmaße der Kreuzreaktionen, da hochavide Antikörper mit größeren Antigenbezirken reagieren als schwächer avide und deshalb für sie die Chance, eine passende Antigendeterminante auf heterologen Antigenen zu finden, wesentlich größer ist (ROLLE und MAYR, 1978; BIER et al., 1979).

2.7.2 Lebensmittelserologie

Über das Auftreten von Kreuzreaktionen im Rahmen von Untersuchungen auf dem Gebiet der Lebensmittelserologie liegen bisher relativ wenige Aussagen vor, obwohl solche unspezifischen Reaktionen auf diesem Sektor keineswegs selten vorkommen. So stellen MERKL (1976) und BAUDNER (1978) fest, daß Anti-Sojaprotein-Seren mit Senfmehl reagieren und die Antikörper gegen Sojaprotein, die de CRIGNIS (1986) aus dem Kolostrum von Kühen gewinnt, reagieren mit Eiweiß-Extrakten aus weißer Bohne und Feuerbohne.

Auch HITCHCOCK et al. (1981) können im Rahmen ihrer Versuche zur Ermittlung von Sojaproteinzusätzen in Fleisch-Erzeugnissen mittels ELISA unspezifische Reaktionen ihrer "spezifischen" Antiseren mit Milch- und Eipulver, Weizenprotein und Feldbohnenprotein feststellen, zumindest in begrenztem Ausmaß.

Weitaus größere Schwierigkeiten als beim Nachweis von Pflanzenproteinen verursachen die Kreuzreaktionen bei der serologischen Identifizierung der Fleischproteine verschiedener mehr oder weniger eng verwandter Tierarten. Über diese Probleme berichten MANZ (1979, 1983, 1985) und KANOUT und MATHOIS (1986). Durch Absättigung der Seren erreichen sie eine Steigerung der Spezifität.

2.7.3 Verbesserung der Serumspezifität

2.7.3.1 Absorption und andere Reinigungsverfahren

MANZ (1979, 1985) fügt zum Zwecke der Absättigung dem jeweiligen Antiserum zum Nachweis einer bestimmten Tierart heterologes Vollserum bzw. verschiedene Muskelextrakte anderer kreuzreagierender Tierarten als Antigene zu, läßt das Gemisch bei verschiedenen Temperaturen stehen und zentrifugiert anschließend ab. Diese Prozedur wird so oft wiederholt, bis im Agar-Gel-Test keine unspezifischen Immunpräzipitate mehr nachweisbar sind.

BIER et al. (1986) schlagen zur Reinigung von Antikörpern als "unspezifische Methoden" die Präzipitation mit Neutralsalzen oder die chromatographische Fraktionierung vor. Als "spezifische Verfahren" empfehlen sie die Dissoziation mit 15 %iger NaCl oder die Dissoziation bei saurem pH.

2.7.3.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist - obwohl ein noch relativ junges Verfahren - in der Biochemie schon weit verbreitet. Es dient dort vor allem zur Gewinnung reiner Substanzen aus Gemischen.

Das Prinzip beruht auf der Ausnutzung der spezifischen reversiblen molekularen Interaktion zwischen biologisch aktiven Substanzen. So wird z.B. ein Antigen an eine als stationäre Phase dienende feste Matrix kovalent gebunden. In der mobilen Phase sind die spezifischen Antikörper enthalten, die mit dem gebundenen Antigen eine reversible Bindung eingehen. Die unspezifischen Bestandteile der mobilen Phase werden ausgewaschen. Anschließend werden die spezifischen Antikörper durch Auflösung der reversiblen Bindung gewonnen.

STARKENSTEIN führt bereits 1910 erste einschlägige Versuche durch, indem er Stärke als Matrix verwendet und daran das Enzym Amylase reinigt.

ENGELHARDT propagiert 1924 das "Prinzip des fixierten Partners", indem er Invertase-Antikörper an Kaolin adsorbiert. CAMPBELL et al. benutzen 1951 erstmals Cellulose als Träger-substanz zur Bindung von Antigenen für die Antikörperreinigung.

Eine bedeutende Weiterentwicklung für die Affinitätschromatographie ist mit der Einführung des Sephadex-Gels (PORATH und FLODIN, 1959) und der Agarose (HJERTEN, 1962; CUATRECASAS et al., 1968) als Matrixmaterialien verbunden. Diese Verbindungen - es sind lineare wasserlösliche Polysaccharide - erfüllen weitgehend alle erforderlichen Bedingungen. Im einzelnen sind das Hydrophilie, Weichmaschigkeit und mechanische Stabilität, chemische Stabilität bei gleichzeitiger chemischer Veränderbarkeit und keine unspezifischen Reaktionen (MOHR und POMMERENING, 1985).

Einen weiteren wichtigen Schritt leiten AXEN et al. (1967) und PORATH et al. (1967) mit der Erkenntnis der starken Verbesserung der Bindungsfähigkeit der Kohlenhydrat-Matrizen durch Behandlung mit Cyanogen-Bromid (CNBr) ein. Durch die Aktivierung mit CNBr werden die Polysaccharide zu Imino-carbonsäureestern umgewandelt, die dann mit den primären Aminogruppen von Proteinen besser reagieren.

Liganden mit niedrigem Molekulargewicht, die aus sterischen Gründen nicht direkt an die Matrix gebunden werden können, können mittels eines sogenannten Spacerarms - einer Seitenkette aus Hexamethyldiamin oder ϵ -Aminocaprinsäure - ohne Beeinflussung ihrer sterischen Aktivität an die Matrix gekoppelt werden (MOHR und POMMERENING, 1985).

Seit Anfang der 70er Jahre werden - basierend auf den o.a. grundlegenden Entwicklungen - viele Modifikationen der Affinitätschromatographie entwickelt (z.B. CUATRECASAS, 1970). Sie werden vor allem zur Reinigung von Enzymen (CUATRECASAS et al., 1968; DOBROWOLSKA et al., 1986), Plasmaproteinen (FREED and HERZENBERG, 1975; SAINT-BLANCARD et al., 1983), Hormonen bzw. Hormonrezeptoren, Antigenen oder Antikörpern und anderen Biomolekülen erfolgreich eingesetzt (WILCHEK et al., 1984).

Zahlreiche Autoren geben, weitgehend übereinstimmend, eine Übersicht über die bisher vorgestellten Verfahren und beschreiben die derzeit angewendeten Matrizen, Aktivierungsmethoden, Elutionsmöglichkeiten und Einsatzarten der Affinitätschromatographie (KRISTIANSEN, 1978; SCOUTEN, 1981; WILCHEK et al., 1984; MOHR und POMMERENING, 1985).

MATERIAL UND METHODEN

3.1

Gewinnung von Antiseren

Zur Gewinnung von Antiseren gegen Sojaprotein wurden Kaninchen mit dem Sojaproteinisolat "Isola PD" (Gewürzwerk H. Laue GmbH & Co, Hamburg) (Zusammensetzung: Rohprotein [Nx6,25] 84,2 %, Fett 0,5 %, Asche 3,6 %, Wasser 5,8 %) immunisiert. Das Antigen wurde mit steriler physiologischer NaCl-Lösung (pNaCl) mittels Ultra-Turrax zu einer 10 %igen homogenen Lösung aufbereitet. Nach 30 Minuten Erhitzung auf 70 °C (Lösungssinnentemperatur) im Schüttelwasserbad erfolgte zur Steigerung der Antikörperbildung die Zugabe von 15 % einer 10 %igen Aluminiumhydroxid-Lösung (RING, 1964) und die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2.

Zur Immunisierung wurden ca. 8 Monate alte, mittelgroße, entwurmt Kaninchen verschiedener Rassen herangezogen, denen in zweitägigem Abstand beidseitig lateral der Dornfortsätze insgesamt 15 Injektionen von je 5 ml der Antigenlösung subcutan verabreicht wurden. Vier Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet und die Seren durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 2000 U/min gewonnen. Anschließend wurden die Seren auf Portionen von 5 ml aufgeteilt, bei -50 °C gefriergetrocknet und im Kühlschrank gelagert.

Neben den selbst hergestellten Antiseren wurde auch ein kommerzielles "Antiserum gegen Sojaprotein" (Nr. 117610A, Behringwerke AG, Marburg) untersucht, das nach Angaben des Herstellers spezifisch reagiert und somit keine Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen eingehen soll.

3.2 Reinigung der Antiseren

Die Reinigung der Anti-Sojaprotein-Seren zur Gewinnung spezifischer Antikörper, d.h. der Ausschluß von Kreuzreaktionen mittels der Affinitätschromatographie, läßt sich in zwei Abschnitte einteilen:

- Vorbereitung des Gels
- Durchführung der Reinigung

3.2.1 Vorbereitung des Gels

Bei diesem Schritt erfolgt die Kopplung des Liganden - Sojaprotein "Isola PD" - an das Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose-Gel und die Absättigung noch freier Bindungsstellen.

3.2.1.1 Material

0,001 M HCl

0,1 M NaHCO₃, pH 8,3

1,0 M NaCl

0,1 M Glycin (gelöst in 0,1 M NaHCO₃)

0,15 M PBS-Puffer, pH 7,2 bestehend aus:

(Phosphatpuffer)	8,50 g NaCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	0,20 g KH ₂ PO ₄
	ad 1 l

CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia GmbH, Freiburg)

Sojaprotein "Isola PD"-Lösungen:

1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 3,0 mg/ml

3,5 mg/ml, gelöst in pNaCl

Wasserstrahlpumpe, Saugflasche, Porzellannutsche

Filter (S&S Schwarzband Nr. 595)

Magnetrührer

3.2.1.2 Methode

Die für die jeweils gewählte Chromatographiesäule erforderliche Menge der gefriergetrockneten CNBr-aktivierten Sepharose 4B wird in 0,001 M HCl gelöst. Dabei ergibt 1 g gefriergetrocknetes Gelpulver etwa 3,5 ml aufgequollenes Gel (= 1 Volumen). Das Gel wird dann auf einer Porzellannutsche mittels Wasserstrahlpumpe und Saugflasche mit 20 Volumen 0,001 M HCl ausgewaschen, um die bei der Gefrier Trocknung zugesetzten Additive zu entfernen. Anschließend wird das Gel trockengesaugt, vorsichtig vom Filter abgehoben und in 1 Volumen 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,3, gelöst.

Der zur Kopplung an das Gel bestimmte Ligand, Sojaproteinlösung mit 1,0, 1,5, 3,0 oder 3,5 mg Protein/ml, wird in adäquater Menge (Ligand : Gel 1:1) ebenfalls mit 1 Volumen 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,3, versetzt und dem Sepharose-Gel zugegeben. Zur Kopplung wird das Gemisch in den Kühlraum, dessen Thermostat auf 4 °C eingestellt ist, verbracht und dort für 3 h auf einem Magnetrührer mit 60 Umdrehungen pro Minute gerührt.

Danach wird das Gel zur Entfernung des nichtgebundenen Sojaproteins auf einer Porzellannutsche mit Wasserstrahlpumpe und Saugflasche nacheinander mit 10 Volumen 0,1 M NaHCO_3 , 10 Volumen 1,0 M NaCl und 10 Volumen 0,1 M NaHCO_3 ausgewaschen, trockengesaugt und vorsichtig abgelöst. Zur Absättigung noch freier Bindungsstellen wird es mit etwa 3 Volumen 0,1 M Glycin versetzt und bei 4 °C im Kühlraum 3 h mit 60 U/min gerührt.

Das überschüssige Glycin wird dann wieder - wie oben angegeben - auf einer Porzellannutsche mit 10 Volumen 0,1 M NaHCO_3 , 10 Volumen 1,0 M NaCl und 20 Volumen 0,15 M PBS-Puffer ausgewaschen. Danach wird das Gel trockengesaugt, vom Filter abgelöst und in 0,15 M PBS-Puffer mit 0,01 % Natrium-Azid(NaN_3)-Zusatz gut verschlossen bis zur Weiterverwendung

bei ca. 6 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Durchführung der Reinigung

3.2.2.1 Versuche mit der Kapillarsäule

Zur Ermittlung der günstigsten Versuchsbedingungen wurden Pasteurpipetten mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Länge von 150 mm verwendet.

3.2.2.1.1 Material

0,15 M PBS-Puffer, pH 7,2 (3.2.1.1)

0,001 M Citrat-Puffer, pH 3,0

CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit gekoppeltem Sojaprotein
(3.2.1.2)

Anti-Sojaprotein-Serum vom Kaninchen

Pasteurpipetten

Filterwatte, Silikonschlauch, Schlauchklemmen

3.2.2.1.2 Methode

Zunächst wird der Auslauf der Pasteurpipette mit Filterwatte verstopft. Auf die Auslaufspitze wird danach ein ca. 10 cm langes Stück Silikonschlauch gesteckt und mit einer Schlauchklemme abgeklemmt. Dadurch ist der Abfluß regulierbar.

Anschließend werden etwa 3 ml der mit Sojaprotein versetzten Sepharose 4B in die Pipette gefüllt und mit 20 ml 0,15 M PBS-Puffer, pH 7,2, gewaschen. Danach werden 1,5 ml Antiserum auf die Säule aufgetragen - in Vorversuchen wurden 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml erprobt - und nach kurzer Einwirkzeit mit 10 ml PBS-Puffer nachgewaschen. Der Durchlauf (DL) mit den unspezi-

fischen Proteinen wird aufgefangen.

Die in der Säule gebundenen spezifischen Anti-Sojaprotein-Antikörper werden im Anschluß mit 10 ml 0,001 M Citrat-Puffer, pH 3,0, herausgelöst, das Eluat wird aufgefangen und sofort mit 0,15 M PBS-Puffer neutralisiert.

Für die erneute Verwendung wird die Säule mit 20 ml PBS-Puffer äquilibriert und in PBS-Puffer mit 0,01 % NaN_3 -Zusatz gut verschlossen im Kühlschrank bei etwa 6 °C aufbewahrt.

Durchlauf und Eluat werden ebenfalls im Kühlschrank oder tiefgefroren bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.2 Versuche mit der Säule C26/40

3.2.2.2.1 Material

0,15 M PBS-Puffer, pH 7,2 (3.2.1.1)

0,001 M Citrat-Puffer, pH 3,0

CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Sojaprotein (1,0 mg/ml) gekoppelt (3.2.1.2)

Anti-Sojaprotein-Serum vom Kaninchen

Glassäule C26/40 (Pharmacia) und 2 Adaptoren (Pharmacia)

Silikonschlauch, Schlauchklemmen

3.2.2.2.2 Methode

Der Querschnitt der Chromatographie-Säule C26/40 mißt 26 mm, die Länge beträgt 400 mm. Das maximale Fassungsvermögen sind 212 ml. Dieses Volumen kann durch den Einsatz von Adaptoren entsprechend verkleinert werden. Bei den eigenen Versuchen wurde durch das Einfüllen von 50 ml Sepharose eine Gelsäule von 70 mm Höhe erreicht.

Die Säule wird der Firmenanleitung entsprechend vorbereitet und am Auslaufschlauch wird ein Stück Silikonschlauch mit Schlauchklemme zur Abflußregulierung angebracht. Anschließend wird das Sepharose-Gel vorsichtig in die Säule gefüllt und mit 0,15 M PBS-Puffer solange gespült, bis sich die Sepharose blasenfrei abgesetzt hat und der Pufferüberstand völlig klar ist. Dann wird der obere Adaptor eingesetzt und unter weiterem Waschen mit PBS-Puffer vorsichtig bis auf die Geloberfläche geschoben und - sofern keine Luftblasen mehr auftreten - in dieser Stellung justiert.

Im Anschluß daran werden über den Zulaufschlauch 25-30 ml Anti-Sojaprotein-Serum auf die Säule aufgetragen. Die unspezifischen Serumbestandteile werden mit ca. 200 ml 0,15 M PBS-Puffer ausgewaschen und der Durchlauf aufgefangen. Danach werden die in der Säule gebundenen spezifischen Anti-Sojaprotein-Antikörper mit etwa 200 ml 0,001 M Citrat-Puffer, pH 3,0, aus ihrer Bindung gelöst und ausgewaschen. Das gewonnene Eluat wird sofort mit PBS-Puffer neutralisiert, um Schädigungen der Antikörper zu vermeiden.

Die Sepharose-Säule wird mit etwa 350 ml PBS-Puffer, pH 7,2, äquilibriert und danach mittels PBS-Puffer mit 0,01 % NaN_3 -Zusatz durchgewaschen. Dann kann sie gut verschlossen im Kühlschrank oder auch bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

In der Säule C26/40 wurden bei verschiedenen Reinigungsdurchgängen Fließgeschwindigkeiten zwischen 100 und 160 ml/Std. gemessen.

3.3 Einengung des Eluates

Zur Verringerung des Eluatvolumens und damit zur Verbesserung der Wirksamkeit wurde ein Teil der Eluate in centricon 30 microconcentrator-Röhrchen (Amicon) zentrifugiert, wodurch eine Verringerung des Ausgangsvolumens auf 1/10 bis 1/15 erreicht werden konnte.

3.4 Vergleichende Prüfung der Antigenspezifität von Antiserum und Eluat

3.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Antigen-Lösungen, der Antiseren und der Eluate erfolgte nach der von LOWRY et al. (1951) entwickelten Methode mit dem Technicon-Auto-Analyzer. Die Berechnung erfolgte dabei anhand von selbsthergestellten Standardlösungen.

3.4.2 Titer-Bestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.4.2.1 Material

96-Loch Mikrotiter-Platten mit flachem Boden (FLOW-Laboratories)

Coating-Puffer, zusammengesetzt aus:

1,59 g Na_2CO_3
 2,93 g NaHCO_3
 ad 1 l Aqua dest.

PBS-Puffer zur Serum- und Konjugatverdünnung, pH 7,2,
zusammengesetzt aus:

80,0 g NaCl
2,0 g KCl
11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
2,0 g KH_2PO_4
1,0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
1,0 g CaCl_2
ad 10 l Aqua dest.

Zur Serumverdünnung wird der PBS-Puffer mit bovinem Serum-Albumin (BSA) zu einer 0,5 %igen BSA-PBS-Lösung angereichert (0,5 g BSA/100ml PBS), zur Konjugatverdünnung zu 4 %iger Lösung (4 g BSA/100 ml).

PBS-Puffer zum Auswaschen, bestehend aus:

80,0 g NaCl
2,0 g KH_2PO_4
14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
2,0 g KCl
5,0 ml Tween 20
ad 10 l Aqua dest.

Konjugat: Anti-Kaninchen-IgG (H+L), gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (ICN-Biochemicals)

Substrat: 1. Flüssigkeit: 60 ml Aqua dest.

100 µl Perhydrol (30 %iges H_2O_2)

2. Flüssigkeit: 9 ml 5-Aminosalizylsäure

1 Tropfen 1 N NaOH für pH-Wert 6,0

von 1. Flüssigkeit 1,0 ml in 2. Flüssigkeit geben
(Angaben für 1 Mikrotiterplatte)

Aminosalizylsäure-Herstellung: 400 mg 5-Aminosalizylsäure ad 500 ml Aqua dest., auf 70 °C erhitzen

Antigene: Sojaproteinisolat "Isola PD"-Lösung

Milcheiweiß "Gervita S"-Lösung

Weizenkleber-Lösung

Hühnereiklar-Lösung

3.4.2.2 Methode

Die Ermittlung des Titers wurde mittels modifiziertem indirektem ELISA-Screening-Test (RING, 1987) durchgeführt.

Hierzu werden zur Beschichtung der Mikrotiterplatten die jeweils verwendeten Antigen-Lösungen - Sojaproteinisolat, Milcheiweiß, Weizenkleber bzw. Hühnereiklar - mit Coating-Puffer auf 20 µg Protein/ml verdünnt und 100 µl je Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platten werden dann auf ein Schüttelgerät verbracht und dort 5-10 min geschüttelt. Danach kommen die Platten 3 h in den Brutschrank (37 °C) und dann 12 h in den Kühlschrank.

Vor der Weiterverwendung werden die Platten in einem dreiteiligen Waschgang mittels Handdusche, PBS-Waschpuffer (mit Tween) und nochmals Handdusche ausgewaschen.

Anschließend werden die in 0,5 %igem BSA-PBS-Puffer unterschiedlich stark vorverdünnten Antisera und Eluate in Mengen von je 100 µl in die erste Reihe der Mikrotiterplatte pipettiert. Eine Ausnahme davon bilden die für den Leerwert und die Kontrollsera vorgesehenen Kavitäten. In die übrigen Reihen werden 50 µl 0,5 %iger BSA-PBS-Puffer pro Kavität vorgelegt. Ausgehend von der ersten Reihe werden dann in die folgenden je 50 µl der Antikörperlösungen dilutiert, die Platten 10 min geschüttelt und zur Inkubation (AG-AK) 50 min in eine feuchte Kammer (37 °C) verbracht.

Nach erneutem Auswaschen mit Handdusche und PBS-Waschpuffer werden in jede Kavität der Platten 50 µl des 1:1000 in 4 %igem BSA-PBS-Puffer verdünnten Konjugates zugegeben. Dann werden die Platten nach 10minütigem Schütteln wieder für 50 min in die feuchte Kammer (37 °C) verbracht.

Nachdem die Mikrotiterplatten wieder ausgewaschen worden sind, werden je Kavität 100 µl des frisch zubereiteten Substrats pipettiert, die Platten 10 min geschüttelt und 50

min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach nochmaligem zehnminütigem Schütteln werden die Extinktionswerte mit dem Titertek Multiskan MC Autoreader bei 510 nm gemessen.

3.4.3 Quantitativer Sojaproteinnachweis in Modellwürsten mittels ELISA

Zum Vergleich der Brauchbarkeit ungereinigter Antiseren und gereinigter Eluate zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in Fleisch-Erzeugnissen wurden verschiedene Modellwürste geprüft. Zur Untersuchung kamen dabei auf 72 °C Kerntemperatur erhitzte Brühwürste mit Zusätzen von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 % Sojaprotein sowie mit Zusätzen von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 % Milchprotein. Außerdem kamen eingedoste, auf 116 °C erhitzte Würste, ebenfalls mit Sojaproteinzusätzen von 0,25, 0,5, 1,0 und 1,5 % zur Untersuchung. Als Kontrollen standen Würste gleicher Herstellung, denen kein Sojaprotein zugesetzt worden war, zur Verfügung.

Die Grundrezeptur der Modellwürste sah dabei aus wie folgt:

- 25 % Rindfleisch (R II)
- 25 % Rindfleisch (R III)
- 25 % Rückenspeck (S III)
- 25 % Eis

Dazu wurden bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge 2 % Nitritpökelsalz sowie 0,3 % Diphosphat und, bezogen auf das Gesamtbrät, 0,03 % Natriumascorbat und 0,4 % Gewürzmischung zugesetzt.

Aus diesem Grundbrät wurden durch Zugabe der verschiedenen o.a. Mengen Soja- bzw. Milcheiweiß (bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge) die verschiedenen Modellwürste hergestellt. Das Grundbrät ohne Fremdeiweißzusätze diente als Kontrolle.

Die Extraktion der Würste erfolgte in Anlehnung an die von ROIDER (1984) vorgeschlagene Methode. Das Untersuchungsmate-

rial wurde dabei in etwa kirschgroße Stücke zerschnitten, tiefgefroren und mit einer Moulinette fein zerkleinert. 5 g davon wurden mit 45 ml - d.h. 1:10 - 6 M Harnstoff versetzt, ca. 12 h im Kühlschrank und anschließend 1 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C extrahiert. Danach wurde das Gemisch 10 min mit 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand filtriert, um eine klare Lösung zu erhalten.

Zur quantitativen Bestimmung des Sojaproteingehaltes mittels ELISA-Screening-Methode (RING, 1987) wurden die Wurstextraktlösungen mit Coating-Puffer 1:250 vorverdünnt und in jede Kavität der ersten Reihe, außer der für den Leerwert, 100 µl pipettiert. In die übrigen Kavitäten wurden je 50 µl Coating-Puffer vorgelegt und ausgehend von der ersten Reihe je 50 µl dilutert.

Nach der Inkubation - 3 h im Brutschrank (37 °C) und 12 h im Kühlschrank (ca. 6 °C) - und dem Auswaschen mit Handdusche und PBS-Waschpuffer wurden je Kavität 50 µl der 1:50 mit 0,5 %igem BSA-PBS-Puffer verdünnten Antikörper-Lösung - Antiserum oder gereinigtes Eluat - zugegeben. Danach wurden die Platten 10 min geschüttelt und anschließend 50 min in die feuchte Kammer (37 °C) gebracht.

Die Zugabe von Konjugat und Substrat sowie die Extinktionsmessung erfolgte wie unter 3.4.2.2 beschrieben.

3.4.4 Indirekte Hämagglutination (IH)

Die Titerbestimmung mit der Indirekten Hämagglutination wurde nach der Beschreibung von RING und SACHER (1984) durchgeführt.

In die 25 bis 30 Agglutinationsröhrchen pro Reihe wurden pro Röhrchen 0,5 ml phys. NaCl-Lösung vorgelegt. In das erste Röhrchen der Reihe wurden 0,5 ml Antiserum bzw. Eluat zugegeben und durch Überpipettieren von je 0,5 ml von Röhrchen zu Röhrchen geometrisch verdünnt. Anschließend wurden 2 Tropfen der vorsichtig aufgetauten und verdünnten Hammelerythrozyten, an die Sojaprotein als Antigen adsorbiert war, jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe zugesetzt. Danach wurde der Ständer mit den Röhrchen gut durchgeschüttelt, 30 min in den Brutschrank bei 37 °C und danach 24 h in den Kühlschrank bei 6-8 °C verbracht. Vor dem Ablesen blieb der Ständer 30 bis 60 min bei Zimmertemperatur stehen. Das Ergebnis wurde über einen gekanteten Spiegel mit einer oberständigen Lichtquelle abgelesen.

Sieben Seren, die von Kaninchen aus dem Versuchstierstall des Institutes für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Universität München gewonnen wurden und ein gewerblich gewonnenes Kaninchen-Serum gegen Sojaprotein wurden jeweils im Verhältnis 1:9 geteilt. Der kleinere Teil blieb unbehandelt zu Vergleichszwecken, der größere Teil wurde affinitätschromatographisch gereinigt. Danach wurden die Titer der beiden Teile gegen Sojaprotein und - zur Prüfung auf Kreuzreaktivität - gleichfalls gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar ermittelt.

Aufgrund der Proteinbestimmung erfolgte die Berechnung der Parameter: spezifische Antikörperaktivität,
Anreicherung,
Titerausbeute,
Proteinausbeute.

Die Berechnung der o.a. Parameter erfolgte wie folgt:

$$\text{spezifische Antikörperaktivität (SA)} = \frac{(\text{Verdünnung})^{*-1}}{\text{mg Protein}}$$

$$\text{Anreicherung} = \frac{\text{spez. Antikörperaktivität, gereinigt (Eluat)}}{\text{spez. Antikörperaktivität, ungereinigt (Serum)}}$$

$$\text{Gesamtantikörperaktivität} = (\text{Verdünnung})^{-1} (\text{ml})^{-1} \times \text{Volumen (ml)}$$

$$\text{Titerausbeute} = \frac{\text{Gesamtantikörperaktivität, gereinigt} \times 100}{\text{Gesamtantikörperaktivität, ungereinigt}}$$

$$\text{Proteinausbeute} = \frac{\text{Gesamtprotein, gereinigt} \times 100}{\text{Gesamtprotein, ungereinigt}}$$

*Verdünnung = Titer

Zur Beurteilung der Reinigungswirkung wurden die Resultate der gereinigten und ungereinigten Serumanteile jeweils miteinander verglichen.

Nachfolgend sind die durchschnittlichen Resultate ($\bar{X}$) der oben beschriebenen Untersuchungen zusammengefaßt. Die Einzelergebnisse dazu sind in den Tabellen 9 bis 40 aufgeführt.

4.1 **Ergebnisse der affinitätschromatographischen Reinigung der Anti-Sojaprotein-Seren aus eigener Gewinnung**

4.1.1 **Ergebnisse der Reinigung mittels Kapillarsäule**

4.1.1.1 **Untersuchung verschiedener Serummengen**

Aus den o.a. Antiseren eigener Gewinnung wurden von den Seren 1 und 2 jeweils 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml auf Säulen, die mit etwa 3 ml Sepharose-Gel, an das eine Sojaproteinlösung von 1,0 mg/ml gekoppelt war, gefüllt waren, zur Reinigung aufgetragen. Das in der Lösung enthaltene Sojaprotein wurde dabei - wie mittels der Proteinbestimmung der nach der Kopp- lung verbleibenden Lösung festgestellt werden konnte - zu mehr als 99 % an das Gel gebunden. Dadurch sollte geklärt werden, inwieweit die aufgetragene Serummenge Einfluß auf die Resultate hat und welche Auftragsvolumina den optimalen Reinigungseffekt erzielen.

4.1.1.1.1 **Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte**

Dabei wurden jeweils die Titer des ungereinigten Antiserums und des gereinigten Eluates gegen das homologe Antigen Soja- protein sowie - zur Prüfung auf Kreuzreaktionen - gegen die heterologen Antigene Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühner-

eiklar bestimmt.

Tab. 3: Durchschnittliche Titerwerte der ungereinigten Antiseren 1 und 2 und der daraus bei Auftrag von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml auf die Säule gewonnenen Eluate und der konzentrierten Eluate bei Auftrag von 1,5 ml (1,5 ml [konz.]) gegen Sojaprotein und die Fremdproteine Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar.

	Sojaprotein	Milcheiweiß	Weizenkleber	Hühnereiklar
Serum 1 (unger.)	1:13540	1:80	1:160	1:245
Eluat aus				
0,5 ml	1:460	-	-	-
1,0 ml	1:477	-	-	-
1,5 ml	1:312	1:2	1:1	1:2
2,0 ml	1:740	1:2	-	-
1,5 ml (konz.)	1:3000	-	1:3	1:1
Serum 2 (unger.)	1:18540	1:256	1:490	1:860
Eluat aus				
0,5 ml	1:98	1:1	-	-
1,0 ml	1:148	1:2	-	-
1,5 ml	1:304	1:1	1:4	1:3
2,0 ml	1:237	1:2	-	-
1,5 ml (konz.)	1:3600	-	1:5	1:2

Die o.a. Ergebnisse der Titerbestimmung der Anti-Sojaprotein-Seren 1 und 2 und der daraus durch affinitätschromatographische Reinigung gewonnenen Eluate zeigen, daß durch die Reini-

gung ein deutlicher Rückgang der Kreuzreaktionen bei den Eluaten erreicht werden kann. Der Titer gegen das homologe Antigen Sojaprotein geht zwar ebenfalls - aufgrund der starken Verdünnung des Eluates - zurück, aber nicht im gleichen Maße wie die Titer gegen die heterologen Antigene. Außerdem ist durch Ankonzentrieren des Eluates hier wieder eine 10- bis 12fache Titersteigerung gegen Sojaprotein zu verzeichnen, während die unspezifischen Reaktionen nahezu unverändert bleiben. Vergleicht man die Titerabschwächung gegen das spezifische Antigen Sojaprotein mit der Abschwächung der Kreuzreaktionen, so wird der Reinigungseffekt deutlich: Bei Antiserum 1 nimmt der Titer gegen Sojaprotein von 1:13540 beim ungereinigten Serum auf 1:3000 beim konzentrierten Eluat um das 5fache ab, während gegen Milcheiweiß keine Kreuzreaktionen mehr feststellbar waren und die Titer gegen Weizenkleber von 1:160 auf 1:3 um das 53fache und gegen Hühnereiklar von 1:245 auf 1:1 um das 245fache gesenkt werden konnten. Bei Antiserum 2 stehen einer Titerabschwächung um ebenfalls das 5fache gegen Sojaprotein das Fehlen von Kreuzreaktionen gegen Milcheiweiß und eine Verminderung um das 98fache gegen Weizenkleber und um das 430fache gegen Hühnereiklar gegenüber.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Auftragsvolumina zeigt bei Serum 1 ein Volumen von 2,0 ml mit einem Anti-Sojaprotein-Titer von 1:740 das beste Ergebnis, während bei Serum 2 mit 1,5 ml Auftrag und einem Titer von 1:304 das beste Resultat erzielt wurde.

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 3 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 12-15 (Serum 1) und 19-23 (Serum 2) im Anhang (8) aufgeführt.

4.1.1.1.2 Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute

Neben den Titerwerten sind für eine umfassende Beurteilung der Reinigungswirkung weitere Parameter zu berücksichtigen. So wurden - ausgehend vom Proteingehalt und dem Titer gegen Sojasprotein - als zusätzliche Bewertungskriterien die spezifische Antikörperaktivität (SA), die Anreicherung des Eluates sowie die Protein- und die Titerausbeute ermittelt.

Tab. 4: Durchschnittliche spezifische Antikörperaktivität, Anreicherung, Titer- und Proteinausbeute der Antiseren 1 und 2 und der daraus bei Auftrag von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml auf die Säule gewonnenen Eluate und der konzentrierten Eluate (konz.) bei Auftrag 1,5 ml.

Serum	Volumen	Proteingehalt mg/ml gesamt		Titer	SA	Anr. (n-fach)	Titer- ausbeute	Protein- ausbeute
Serum 1	0,5 ml	85,0	42,5	1:13540	159			
Eluat	21,0 ml	0,03	0,6	1:460	15333	96	143 %	1,4 %
Serum 1	1,0 ml	85,0	85,0	1:13540	159			
Eluat	20,0 ml	0,04	0,8	1:477	11925	75	72 %	0,9 %
Serum 1	1,5 ml	85,0	127,5	1:13540	159			
Eluat	15,5 ml	0,04	0,6	1:312	7800	49	24 %	0,5 %
konz.	1,0 ml	0,6	0,6	1:3000	5000	31	15 %	0,5 %
Serum 1	2,0 ml	85,0	170,0	1:13540	159			
Eluat	21,0 ml	0,05	1,1	1:740	14800	93	57 %	0,6 %
Serum 2	0,5 ml	97,0	48,5	1:18540	191			
Eluat	22,0 ml	0,03	0,7	1:98	3267	17	23 %	1,4 %
Serum 2	1,0 ml	97,0	97,0	1:18540	191			
Eluat	21,0 ml	0,04	0,8	1:148	3700	19	17 %	0,8 %
Serum 2	1,5 ml	97,0	145,5	1:18540	191			
Eluat	16,0 ml	0,07	1,1	1:304	4343	23	18 %	0,8 %
konz.	1,0 ml	0,7	0,7	1:3600	5143	27	13 %	0,5 %
Serum 2	2,0 ml	97,0	194,0	1:18540	191			
Eluat	19,0 ml	0,07	1,3	1:237	3386	18	12 %	0,7 %

Die hier aufgeführten Durchschnittswerte wurden aus den Anti-Sojaprotein-Titern und den bei der Proteinbestimmung ermittelten Proteingehalten mittels der unter 4 angeführten Formeln berechnet.

Bei beiden Seren steigt mit zunehmendem Serumauflauf der Proteingehalt der Eluate leicht an, die Proteinausbeute nimmt dagegen etwas ab, sie liegt jedoch mit $1,0 \pm 0,5 \%$ ebenso wie die unterschiedlichen Proteingehalte noch im normalen Schwankungsbereich. Die höheren Werte von Serum 1 bei den Parametern spezifische Antikörperaktivität (SA), Anreicherung und Titerausbeute gegenüber Serum 2 beruhen auf den deutlich höheren Titerwerten der Eluate und dem etwas geringeren Titer des ungereinigten Antiserums. Mit einer durchschnittlichen Steigerung der spezifischen Aktivität der Eluate um das 70- (Serum 1) bzw. 20fache (Serum 2) gegenüber den ungereinigten Antiseren wird jedoch bei beiden Seren die positive Wirkung der Reinigung deutlich.

Als am besten geeignete Auftragsvolumina erweisen sich bei Berücksichtigung aller Parameter bei Serum 1 ein Volumen von 2,0 ml und bei Serum 2 ein Volumen von 1,5 ml.

Die durch die Ankonzentrierung des Eluates erreichte Titersteigerung erfolgt in etwa analog dem Anstieg des Proteingehaltes.

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 4 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 9-11 (Serum 1) und 16-18 (Serum 2) im Anhang (8) aufgeführt.

4.1.1.2 Untersuchung verschieden starker Gel-Beschichtungen

Zur Prüfung, ob die Ausbeute gegenüber den bisherigen Versuchen weiter verbessert werden kann, wurden statt der bisher verwendeten Antigenlösung mit 1,0 mg Sojaprotein/ml nunmehr Antigenlösungen mit 1,5, 3,0 und 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Sepharose-Gel gekoppelt und in der unter 4 einleitend beschriebenen Reihenfolge untersucht.

4.1.1.2.1 Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte

Im Rahmen eines Vergleiches der durchschnittlichen Titer-Werte wurden die Titer des ungereinigten Antiserums und des gereinigten Eluates jeweils gegen das homologe Antigen Sojaprotein sowie - zur Prüfung auf Kreuzreaktionen - gegen die heterologen Antigene Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar bestimmt.

Tab. 5: Durchschnittliche Titerwerte des ungereinigten Antiserums 6 und der daraus gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.) bei Kopplung einer Sojaproteinlösung von 1,5, 3,0 und 3,5 mg/ml an das Gel sowie des Antiserums 7 und der daraus gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.) bei Kopplung einer Lösung von 1,5 und 3,0 mg/ml an das Gel gegen Sojaprotein und die Fremdproteine Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar.

	Sojaprotein	Milcheiweiß	Weizenkleber	Hühnereiklar
Kopplung 1,5 mg/ml				
Serum 6	1:28800	1:60	1:90	1:140
(unger.)				
Eluat 6	1:800	-	1:10	1:10
konz.	1:12800	1:60	1:80	1:80
Serum 7	1:12800	1:117	1:259	1:223
(unger.)				
Eluat 7	1:400	1:1	1:5	-
konz.	1:5000	1:21	1:14	1:27
Kopplung 3,0 mg/ml				
Serum 6	1:28800	1:60	1:90	1:140
(unger.)				
Eluat 6	1:800	1:10	1:10	1:10
konz.	1:12800	1:73	1:87	1:93
Serum 7	1:12800	1:117	1:259	1:223
(unger.)				
Eluat 7	1:400	1:1	1:6	1:3
konz.	1:3700	1:21	1:25	1:40
Kopplung 3,5 mg/ml				
Serum 6	1:28800	1:60	1:90	1:140
(unger.)				
Eluat 6	1:800	-	1:5	1:5
konz.	1:12800	1:60	1:60	1:120

Die hier aufgeführten Durchschnittswerte zeigen die Ergebnisse der Antiseren 6 und 7 und der daraus durch die Affinitätschromatographische Reinigung gewonnenen Eluate bei der Kopplung unterschiedlich starker Antigenlösungen an das Gel. Bei den spezifischen Reaktionen mit dem Sojaprotein sind dabei keine Veränderungen der Eluattiter durch eine erhöhte Antigen-Kopplung zu erkennen, die Werte bleiben bei Serum 6 sowohl beim Eluat mit 1:800 als auch beim konzentrierten Eluat mit 1:12800 jeweils konstant. Die Kreuzreaktionen mit den Fremdproteinen bleiben ebenfalls in etwa gleich, nur bei den Titern gegen Hühnereiklar zeigt sich eine geringe Zunahme. Vergleicht man zur Überprüfung der Reinigungswirkung z.B. die Titerwerte von Antiserum 6 und dem konzentrierten Eluat 6 bei Kopplung von 3,0 mg Protein/ml, so sinkt der spezifische Titer gegen Sojaprotein von 1:28800 auf 1:12800 um das 2,25fache, bei den Kreuzreaktionen zeigt sich dagegen gegen Milcheiweiß ein Anstieg um das 1,2fache von 1:60 auf 1:73, während der Titer gegen Weizenkleber mit 1:87 zu 1:90 nahezu unverändert bleibt und der Titer gegen Hühnereiklar von 1:140 auf 1:93 um das 1,5fache abnimmt. Die Werte des konzentrierten Eluates 7 sind mit einer 5- bis 10fachen Verminderung der Kreuzreaktionen etwas besser.

Aus den hier erzielten Ergebnissen ist zu ersehen, daß durch eine vermehrte Kopplung von Antigen an die Chromatographiesäule keine Verbesserung der Resultate zu erreichen ist. Die Reinigungswirkung kann aufgrund der hohen Kreuzreaktionswerte nur als gering bezeichnet werden und ist wesentlich schlechter als bei Kopplung einer Antigenlösung mit 1,0 mg Protein/ml an das Gel (vgl. Tab. 7).

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 5 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 35 und 36 (Serum 6) und 39 und 40 (Serum 7) aufgeführt.

4.1.1.2.2 Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute

Wie oben (4.1.1.1.2) bereits erwähnt, sind neben den Titerwerten weitere Parameter erforderlich, um die Reinigungswirkung umfassend beurteilen zu können. So wurden - ausgehend vom Proteingehalt und dem Titer gegen Sojaprotein - als zusätzliche Bewertungskriterien die spezifische Antikörperaktivität (SA), die Anreicherung des Eluates sowie die Protein- und die Titerausbeute ermittelt.

Tab. 6: Durchschnittliche spezifische Antikörperaktivität, Anreicherung, Titer- und Proteinausbeute des Antiserums 6 und der daraus gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.) bei Kopplung einer Sojaproteinlösung von 1,5, 3,0 und 3,5 mg/ml an das Gel sowie des Antiserums 7 und der daraus gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.) bei Kopplung einer Lösung von 1,5 und 3,0 mg/ml an das Gel.

Serum	Volumen	Proteingehalt mg/ml gesamt		Titer	SA	Anr. (n-fach)	Titer- ausbeute	Protein- ausbeute
Kopplung 1,5 mg/ml								
Serum 6	2,0 ml	100,0	200,0	1:28800	288			
Eluat 6	22,0 ml	0,06	1,3	1:800	13333	46	31 %	0,7 %
konz.	1,5 ml	0,9	1,3	1:12800	14222	49	33 %	0,7 %
Kopplung 3,0 mg/ml								
Serum 7	2,0 ml	40,0	80,0	1:12800	320			
Eluat 7	25,0 ml	0,05	1,3	1:400	8000	25	39 %	1,6 %
konz.	3,5 ml	0,3	1,1	1:5000	16667	52	68 %	1,4 %
Kopplung 3,5 mg/ml								
Eluat 6	23,0 ml	0,11	2,5	1:800	7273	25	32 %	1,3 %
konz.	1,3 ml	1,9	2,5	1:12800	6737	23	29 %	1,3 %
Eluat 7	25,0 ml	0,03	0,75	1:400	13333	42	39 %	0,9 %
konz.	2,0 ml	0,3	0,6	1:3700	12333	39	29 %	0,8 %
Kopplung 3,5 mg/ml								
Serum 3	2,0 ml	86,0	172,0	1:29090	338			
Eluat 3	25,0 ml	0,1	2,5	1:530	5300	16	23 %	1,5 %
konz.	3,5 ml	0,6	2,1	1:5600	9333	28	34 %	1,2 %
Serum 6	2,0 ml	100,0	200,0	1:28800	288			
Eluat 6	25,0 ml	0,08	2,0	1:800	10000	35	35 %	1,0 %
konz.	1,5 ml	1,3	2,0	1:12800	9846	34	33 %	1,0 %

Wie bereits bei Tab. 4 erwähnt, wurden die hier aufgezeigten Durchschnittswerte aus den Anti-Sojaprotein-Titern und den mittels Proteinbestimmung ermittelten Proteingehalten anhand der unter 4 angeführten Formeln berechnet.

Bei Serum 6 steigt zwar erwartungsgemäß der Proteingehalt/ml bei Verdopplung der Antigenkopplungsrate deutlich an - ebenso wie die Proteinausbeute. Bei einer durchschnittlichen Proteinausbeute von $1,0 \pm 0,3 \%$ sind allerdings keine signifikanten Veränderungen erkennbar. Die spezifische Antikörperaktivität (SA) und die Anreicherung gegenüber dem ungereinigten Serum zeigen - bedingt durch die gleichbleibenden Titerwerte bei ansteigendem Proteingehalt - mit zunehmender Kopplungsrate eine sinkende Tendenz, allerdings liegen auch diese Werte innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Die Titerausbeute bleibt aufgrund der gleichen Titerwerte und der fast identischen Volumina der einzelnen Eluate bei allen drei Kopplungsversuchen mit etwa 33 % nahezu konstant.

Aufgrund der bei diesen Parametern erzielten Ergebnisse lassen sich keine eindeutigen Aussagen machen, ob eine Erhöhung der Antigenkopplungsrate eine Verbesserung der Resultate zur Folge hat, da alle Werte innerhalb eines als normal zu betrachtenden Schwankungsbereiches liegen.

Nimmt man allerdings die Ergebnisse aus Tabelle 5 hinzu, so muß man anhand der nicht oder nur geringfügig verminderten Kreuzreaktionen die Kopplung höherer Antigenmengen an das Gel als ungeeignet ansehen, zumal in den Versuchen mit 1,0 mg Protein/ml die Ergebnisse deutlich besser waren (s. Tab. 7).

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 6 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 33 und 34 (Serum 6) sowie 37 und 38 (Serum 7) aufgeführt.

4.1.2 Ergebnisse der Reinigung mittels Chromatographie-Säule C26/40

Zur Reinigung größerer Mengen Antiserum wurden die in den Versuchen an den Kapillarsäulen in kleinem Maßstab ermittelten Ergebnisse auf die große Chromatographie-Säule C26/40 übertragen, die mit 50 ml Sepharose-Gel, an das eine Antigenlösung von 1,0 mg Sojaprotein/ml gekoppelt worden war, gefüllt wurde. Die Seren und Eluate wurden dabei nach den gleichen Kriterien beurteilt wie bei den Versuchen an der Kapillarsäule.

4.1.2.1 Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte

Es wurden jeweils die Titer des ungereinigten Antiserums und des gereinigten Eluates gegen das homologe Antigen Sojaprotein sowie gegen die heterologen Antigene Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar zur Prüfung auf Kreuzreaktionen bestimmt.

Tab. 7: Durchschnittliche Titerwerte der ungereinigten Antiseren 1, 3, 4, 5, 6 und 7 und der daraus bei Reinigung in der Säule C26/40 gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.) gegen Sojaprotein und die Fremdproteine Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar.

	Sojaprotein	Milcheiweiß	Weizenkleber	Hühnereiklar
Serum 1	1:13540	1:80	1:160	1:245
(unger.)				
Eluat	1:800	1:2	1:3	1:3
konz.	1:9600	1:7	1:14	1:14
Serum 3	1:29090	1:110	1:440	1:1540
(unger.)				
Eluat	1:300	-	1:1	1:1
konz.	1:5164	1:1	1:5	1:10
Serum 4	1:23770	1:57	1:880	1:1737
(unger.)				
Eluat	1:200	-	1:1	1:4
konz.	1:977	-	1:2	1:7
Serum 5	1:29440	1:110	1:1200	1:1490
(unger.)				
Eluat	1:250	1:1	1:4	1:2
konz.	1:3733	1:4	1:9	1:10
Serum 6	1:28800	1:60	1:90	1:140
(unger.)				
Eluat	1:325	1:3	-	1:5
konz.	1:5840	1:8	1:10	1:10
Serum 7	1:12800	1:120	1:260	1:220
(unger.)				
Eluat	1:640	-	1:5	1:5
konz.	1:6400	1:10	1:20	1:20

Wie aus den o.a. Durchschnitts-Titerwerten hervorgeht, weisen die einzelnen Antiseren große Differenzen untereinander auf. So liegen die Titer der ungereinigten Antiseren gegen das homologe Antigen Sojaprotein zwischen 1:12800 und 1:29440, während die Titer der Eluate nach der Reinigung auf 1:200 bis 1:800 absinken. Durch Ankonzentrierung können sie aber mit Titern von 1:977 bis 1:9600 wieder auf etwa das 12fache, in etwa analog der Proteingehaltserhöhung, gesteigert werden. Auch bei Kreuzreaktionen mit Fremdproteinen zeigen die einzelnen Seren z.T. erhebliche Unterschiede. Während die Reaktionen mit Milcheiweiß bei allen Seren relativ gering sind, stehen den gegen Weizenkleber und Hühnereiklar ebenfalls nur schwach reagierenden Seren 1, 6 und 7 die starken Reaktionen der Seren 3, 4 und 5 gegenüber.

Die Wirkung der affinitätschromatographischen Reinigung wird besonders bei Serum 4 deutlich. Einem Rückgang des spezifischen Titors gegen Sojaprotein um das 24fache von 1:23770 beim ungereinigten Antiserum auf 1:977 beim gereinigten und konzentrierten Eluat stehen die vollständige Ausschaltung der Kreuzreaktionen mit Milcheiweiß und die Verminderung der Kreuzreaktionen mit Weizenkleber um das 440fache von 1:880 auf 1:2 und mit Hühnereiklar um das 248fache von 1:1737 auf 1:7 gegenüber. Der prozentuale Anteil der Kreuzreaktionen an den spezifischen Titern sinkt hierbei von 3,7 bzw. 7,3 % für Weizenkleber und Hühnereiklar vor der Reinigung auf 0,2 bzw. 0,7 % beim konzentrierten Eluat. Dies belegt, daß der spezifische Titer beim Eluat zu mehr als 99 % tatsächlich durch spezifische Reaktionen erzielt wird.

Die hier aufgeführten Ergebnisse beweisen, daß die affinitätschromatographische Reinigung eine fast vollständige Ausschaltung von Kreuzreaktionen bei verhältnismäßig geringer, durch Ankonzentrieren weitgehend ausgleichbarer Abschwächung des spezifischen Titors gewährleistet.

Darüber hinaus zeigt sich, daß die in der Kapillarsäule erzielten Ergebnisse auch in großem Maßstab in der Säule C26/40

erreicht und z.T. sogar noch übertroffen werden. Diese Umsetzung ist also ohne weiteres durchführbar und erfolgreich.

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 7 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 (Serum 1), 26 (Serum 3), 29 (Serum 4), 31 (Serum 5), 35 (Serum 6) und 39 (Serum 7) im Anhang (8) aufgeführt.

4.1.2.2 Durchschnittliche spez. Antikörperaktivität, Titer- und Proteinausbeute

Wie bei den Untersuchungen an den Kapillarsäulen bereits aufgeführt, sind für eine umfassende Beurteilung der Reinigungswirkung neben den Titerwerten noch weitere Parameter zu berücksichtigen. So wurden - ausgehend vom Proteingehalt und dem Titer gegen Sojaprotein - als zusätzliche Bewertungskriterien die spezifische Antikörperaktivität (SA), die Anreicherung des Eluates sowie die Protein- und Titerausbeute ermittelt.

Tab. 8: Durchschnittliche spezifische Antikörperaktivität, Anreicherung, Titer- und Proteinausbeute der Antisera 1, 3, 4, 5, 6 und 7 und der daraus bei Reinigung an der Säule C26 40 gewonnenen Eluate und konzentrierten Eluate (konz.).

Serum	Volumen	Proteingehalt mg/ml	gesamt	Titer	SA	Anr. (n-fach)	Titer- ausbeute	Protein- ausbeute
Serum 1	25 ml	65,0	1625,0	1:13540	208			
Eluat	380 ml	0,06	23,0	1:800	13333	64	90 %	1,4 %
konz.	17 ml	1,35	23,0	1:9600	7111	34	48 %	1,4 %
Serum 3	25 ml	89,0	2225,0	1:29090	327			
Eluat	520 ml	0,05	26,0	1:300	6000	18	21 %	1,2 %
konz.	37 ml	0,7	26,0	1:5164	7877	23	26 %	1,2 %
Serum 4	25 ml	119,0	2975,0	1:23770	200			
Eluat	500 ml	0,05	25,0	1:200	4000	20	17 %	0,8 %
konz.	35 ml	0,7	24,5	1:977	1396	7	6 %	0,8 %
Serum 5	30 ml	137,0	4110,0	1:29440	215			
Eluat	550 ml	0,06	33,0	1:250	4167	19	16 %	0,8 %
konz.	27 ml	1,2	32,5	1:3730	3108	14	11 %	0,8 %
Serum 6	35 ml	110,0	3885,0	1:28800	259			
Eluat	450 ml	0,08	36,0	1:600	7500	29	27 %	0,9 %
konz. 1	115 ml	0,3	34,5	1:6400	21333	82	73 %	0,9 %
konz. 2	30 ml	1,2	36,0	1:12800	10667	41	38 %	0,9 %
Serum 6	30 ml	111,0	3330,0	1:28800	259			
Eluat	360 ml	0,02	7,2	1:50	2500	10	2 %	0,2 %
konz.	11 ml	0,6	6,6	1:400	667	3	1 %	0,1 %
Serum 6	15 ml	111,0	1665,0	1:28800	259			
Eluat	200 ml	0,01	2,0	1:50	5000	19	2 %	0,1 %
konz.	10 ml	0,2	2,0	1:3200	16000	62	7 %	0,1 %
Serum 7	15 ml	42,0	630,0	1:12800	305			
Eluat	205 ml	0,18	37,0	1:640	3556	12	68 %	5,9 %
konz.	42 ml	0,8	34,0	1:6400	8000	26	140 %	5,4 %

Die oben aufgeführten Durchschnittswerte der verschiedenen Seren für die Reinigung an der Chromatographie-Säule C26/40 wurden wie bei den Werten in den Tabellen 4 und 6 bereits erläutert berechnet.

Es zeigt sich, daß unabhängig vom Proteingehalt des ungereinigten Antiserums der Proteingehalt der gereinigten Eluate 1, 3, 4, 5 und 6 mit 0,05 bis 0,08 mg/ml nahezu gleich ist und demzufolge auch die Proteinausbeute mit $1,1 \pm 0,3$ % nur geringe Schwankungen aufweist. Aus dem Rahmen fällt allerdings Serum 7, wo der Proteingehalt des Eluates mit 0,18 mg/ml - trotz des geringen Ausgangsproteingehaltes von 42 mg/ml dreimal so hoch liegt wie bei den übrigen Seren, was auch in der Proteinausbeute von 5,8 % zum Ausdruck kommt. Die anderen Parameter liegen jedoch innerhalb der Schwankungsbreite der anderen Seren.

Die bei Serum 6 mit Auftragsvolumina von 30 und 15 ml erzielten Ergebnisse von 0,2 bzw. 0,1 % Proteinausbeute wurden an einer mehrfach benutzen und anschließend etwa drei Monate bei Zimmertemperatur aufbewahrten Gel-Säule erhalten. Sie zeigen, daß durch längeres Stehenlassen bei Zimmertemperatur ein deutlicher Rückgang der Reinigungswirkung zu erwarten ist, der auch durch Halbierung des Auftragsvolumens nicht verbessert werden kann.

Die spezifische Antikörperaktivität zeigt bei allen Seren eine deutliche Erhöhung beim Eluat im Vergleich mit dem ungereinigten Antiserum. Im Mittel aller sechs Seren steigt die spezifische Antikörperaktivität von 252 bei den ungereinigten Seren auf 5757 bei den Eluaten bzw. 8407 bei den konzentrierten Eluaten, was Anreicherungen um das 23 bzw. 33 fache entspricht. Die Titerausbeute weist zwar - bedingt durch die schwankenden Titerwerte - eine gewisse Streuung auf, zeigt aber mit durchschnittlich 35 %, daß mehr als ein Drittel der Gesamtaktivität des ungereinigten Serums im Eluat enthalten ist.

Auch diese Ergebnisse bestätigen die bei Tab. 7 gemachte Feststellung, daß die Umsetzung von der Kapillarsäule auf eine große Säule problemlos und mit z.T. noch verbesserten Resultaten möglich ist.

Die den Durchschnittswerten von Tabelle 8 zugrundeliegenden Einzelergebnisse sind in den Tabellen 11 (Serum 1), 24 (Serum 3), 28 (Serum 4), 30 (Serum 5), 32 und 33 (Serum 6) und 37 (Serum 7) im Anhang (8) aufgeführt.

4.2 Ergebnisse der Reinigung eines kommerziellen Anti-Sojaprotein-Serums

4.2.1 Vergleich der durchschnittlichen Titer-Werte

Dabei wurden die Titer des ungereinigten Antiserums und des gereinigten Eluates jeweils gegen das homologe Antigen Sojaprotein sowie gegen die heterologen Antigene Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar zur Prüfung auf Kreuzreaktionen bestimmt.

	Sojaprotein	Milcheiweiß	Weizenkleber	Hühnereiklar
Serum	1:25600	1:160	1:40	1:80
(unger.)				
Eluat	1:25	-	-	-
konz.	1:100	-	-	-

4.2.2 Durchschnittliche spez. Antikörper-Aktivität, Titer- und Proteinausbeute

Wie bereits bei den eigenen Seren ausgeführt (4.1.1.1.2 und 4.1.1.2.2) wurden auch hier zur umfassenden Beurteilung die Parameter spez. Antikörperaktivität (SA), Anreicherung des Eluates sowie Protein- und Titerausbeute ermittelt.

	Volumen	Proteingehalt	Titer	SA	Anr.	Titer-	Protein-
	mg/ml	gesamt			(n-fach)	ausbeute	
Serum	0,9 ml	78,0	70,0	1:25600	328		
Eluat	21,0 ml	0,03	0,6	1:25	833	3	2 %
konz.	1,5 ml	0,4	0,6	1:100	250	1	1 %

Aus den Resultaten von 4.2.1 und 4.2.2 wird ersichtlich, daß bei den kommerziellen Antiseren ebenfalls Kreuzreaktionen auftreten können, obwohl auf dem jeweiligen Beipackzettel ausschließlich homologe Reaktionen zugesichert werden. Durch die Reinigung wurden zwar die unspezifischen Reaktionen ausgeschaltet, die spezifische Antikörperaktivität stieg aber auch nur geringfügig an und lag ebenso wie der spezifische Titerwert weit unter den Vergleichswerten der selbstgewonnenen Antiseren. Allerdings war hier das zur Antikörpergewinnung benutzte homologe Sojaprotein nicht bekannt, die Reinigung erfolgte daher an den eigenen Antigenen. Eine allgemeingültige Aussage über den Nutzen der affinitätschromatographischen Reinigung von kommerziellen Antiseren läßt sich aus den o.a. Ausführungen nicht ableiten, da für diese Untersuchung - aus Kostengründen - nur 1 ml Antiserum verfügbar war und für eine umfassende Beurteilung noch weitere Versuche erforderlich wären.

4.3 **Ergebnisse der Messung mittels Indirekter Häm- agglutination (IH)**

Zur Verifizierung der mittels ELISA erzielten Ergebnisse und zur Prüfung, ob die gereinigten Antiseren auch für die Indirekte Hämagglutination zu quantitativen Nachweiszwecken geeignet sind, wurden die nachfolgend aufgeführten Eluate mit der IH getestet.

Serum 1:	1: 16364	Eluat 1:	1: 16
Serum 2:	1: 65456	Eluat 2:	1: 128
Serum 3:	1:130912	Eluat 3:	1:1024
			(konz.)
Serum 4:	1:130912	Eluat 4:	1: 512
			(konz.)
Serum 5:	1:261824	Eluat 5:	1:1024
			(konz.)

Aus den o.a. Titern der Eluate ist ersichtlich, daß gereinigte Seren beim Einsatz in der IH stärkere Abschwächungen aufweisen als im ELISA. Desungeachtet ist die Verwendung konzentrierter, gereinigter Antiseren in der IH aber durchaus angezeigt, sie läßt zuverlässigere und sichere Ergebnisse erwarten.

4.4 Quantitativer Sojaproteinnachweis in Fleisch-Erzeugnissen mittels ELISA

4.4.1 Nachweis in auf 72 °C erhitzten Brühwürsten

Brühwürste mit unterschiedlichen Zusätzen an Sojaprotein wurden mit gereinigten Antisera auf den Nachweis dieser Zusätze untersucht. Dabei war die Abstufung der einzelnen Zusatzmengen auf der Mikrotiterplatte zumeist bereits visuell erkennbar. Als vorteilhaft erwies sich hierbei eine Vorverdünnung von 1:50 bzw. 1:100 für Eluat bzw. konzentriertes Eluat.

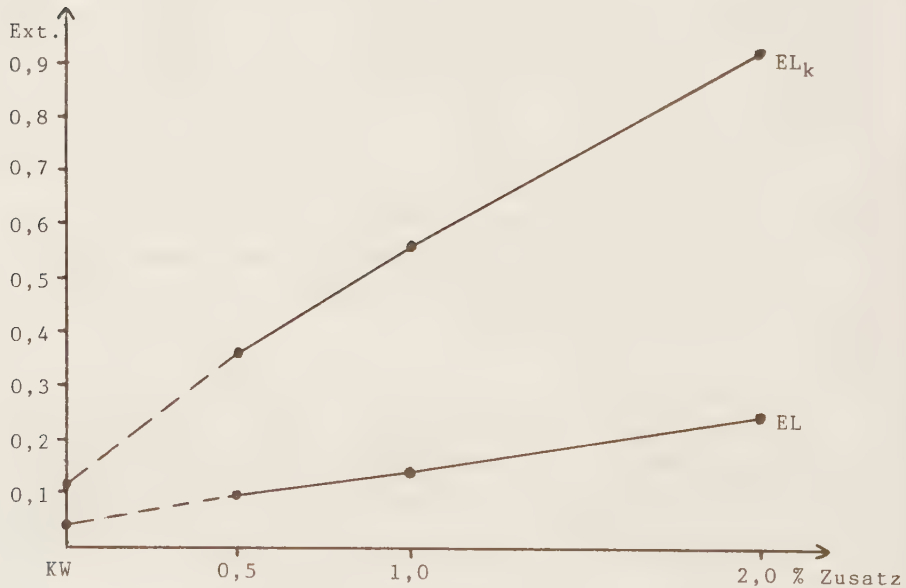
Abb. 1: Protokoll einer Untersuchung von Modellbrühwürsten mit 0,5 %, 1,0 % oder 2,0 % Sojaproteinzusatz. Zum Einsatz kamen sowohl Eluat (EL) als auch konzentriertes Eluat (EL_k).

1	2	KW		0,5 %		1,0 %		2,0 %		11	12	Wurstextrakt-Verdünnung. (s. 3.4.3)
		3	4	5	6	7	8	9	10			
									+			1:8000
							+		+			1:4000
					+		+	+	+			1:2000
					+		+	+	+			1:1000
			+		+	+	+	+	+			1: 500
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+			1: 250
KS	-	EL	EL _k	EL	EL _k	EL	EL _k	EL	EL _k			

Erklärung der Abkürzungen: KW = Kontrollwurst (ohne Zusatz

von Sojaprotein); KS = Leerwert; - = Kontrollserum (ohne Anti-Sojaprotein-Antikörper); + bzw. - = Farbumschlag des Substrates positiv bzw. negativ (= Extinktion $>/< 0,1$)

Abb. 2: Extinktionskurve von EL und EL_k gegen verschiedene Sojaproteinzusätze in Brühwürsten.



Sowohl aus dem ELISA-Protokoll als auch aus der anhand der photometrisch gewonnenen Extinktionswerte erstellten Kurve ist ersichtlich, daß quantitative Sojaproteinnachweise und eine Differenzierung verschiedener Zusatzmengen in Brühwürsten mit Eluaten und konzentrierten Eluaten zuverlässig möglich sind.

4.4.2 Nachweis in auf 116 °C erhitzten Dosenwürsten

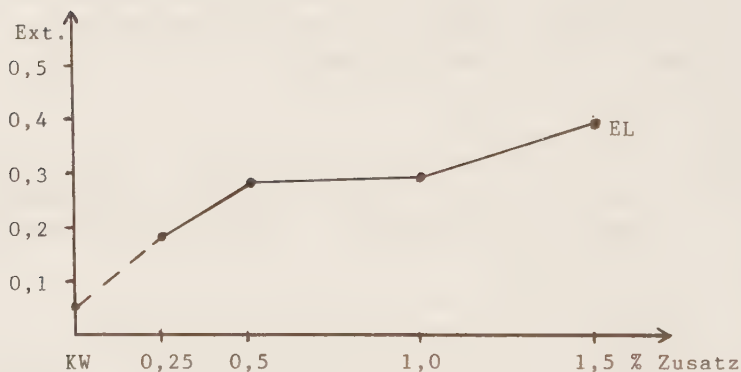
In hochoerhitzten Dosenwürsten konnten mit dem gereinigten Anti-Sojaprotein-Serum (Eluat) unterschiedlich hohe Sojaproteinzusätze jeweils quantitativ nachgewiesen werden. Eine Vorverdünnung des Eluates im Verhältnis 1:50 erwies sich auch bei diesen Untersuchungen als optimal.

Abb. 3: Protokoll einer ELISA-Untersuchung von Dosenwürsten mit 0,25 %, 0,5 %, 1,0 % und 1,5 % Sojaproteinzusatz mittels Eluat (EL) (jeweils Doppelproben).

1	2	KW		0,25 %		0,5 %		1,0 %		1,5 %		Wurst- extrakt- Verdünnung.
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
										+	+	1:4000
						+	+	+	+	+	+	1:2000
				+	+	+	+	+	+	+	+	1:1000
				+	+	+	+	+	+	+	+	1: 500
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1: 250
KS		-		EL		EL		EL		EL		

Erklärung der Abkürzungen: s. Abb. 1

Abb. 4: Extinktionskurve von EL gegen verschiedene Sojaproteinzusätze in Dosenwürsten.



Sowohl aus dem ELISA-Protokoll als auch aus der anhand der photometrisch gewonnenen Extinktionswerte erstellten Kurve ist ersichtlich, daß quantitative Sojaproteinnachweise und eine Differenzierung verschiedener Zusatzmengen mit Eluaten selbst in Dosenwürsten möglich sind. Einschränkend ist allerdings anzumerken, daß zwischen Zusätzen von 0,5 und 1,0 % keine Differenzierung möglich war, wobei ungeklärt bleiben mußte, ob die Ursache nicht in einer falschen Einwaage oder einer falschen Etikettierung der kommerziell und unter Praxisbedingungen eingedosten und erhitzten Modellwürste zu suchen ist.

4.4.3 Prüfung der Antigenspezifität des Eluates im Rahmen des Nachweises von Fremdeiweißzusätzen in Brühwürsten

Zur Prüfung, ob der im Test gegen reines Milcheiweißpulver nachgewiesene Ausschluß von Kreuzreaktionen auch im Falle von Fremdeiweiß-Zusätzen in Fleisch-Erzeugnissen Bestand hat, wurden auf 72 °C erhitzte Modellbrühwürste mit Zusätzen an Milcheiweiß von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 % im Vergleich zu Würsten mit analogen Zusätzen an Sojaprotein untersucht.

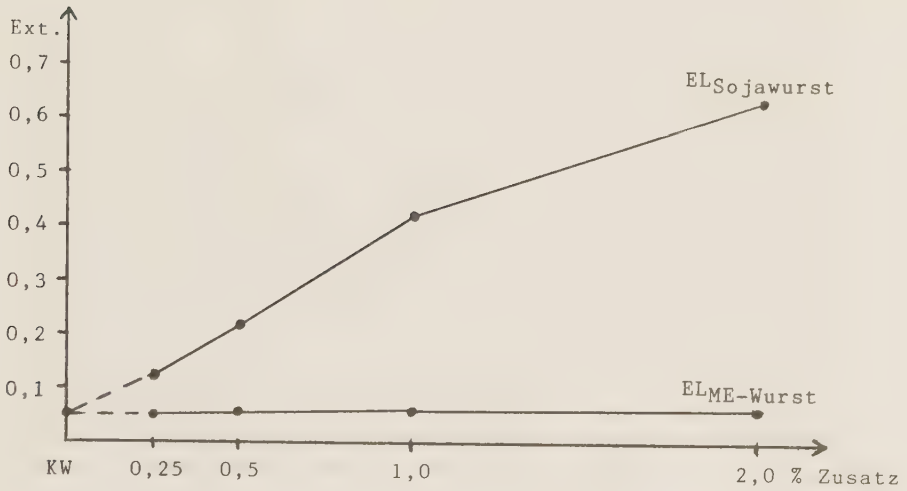
Aus den Reaktionen ist ersichtlich, daß die gereinigten Anti-Sojaprotein-Seren auch im Falle von Milcheiweißzusätzen in erhitzten Waren nicht mit diesen reagieren. Im Falle von Sojaproteinzusätzen erlauben sie jedoch eine eindeutige Differenzierung zwischen den jeweiligen Zusatzmengen.

Abb. 5: Protokoll einer ELISA-Untersuchung von Modellbrühwürsten mit Sojaprotein- bzw. Milcheiweißzusätzen von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 % mittels Eluat (EL).

Soja							Milcheiweiß					Wurstextrakt-Verdünnung.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
						+						1:4000
					+	+						1:2000
				+	+	+						1:1000
			+	+	+	+						1: 500
-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1: 250
KS	-	KW	0,25	0,5	1,0	2,0	KW	0,25	0,5	1,0	2,0	
							Eluat					

Erklärung der Abkürzungen: s. Abb. 1

Abb. 6: Extinktionskurven von EL gegen Brühwürste mit Soja-proteinzusätzen im Vergleich zu Würsten mit Milcheiweißzusätzen.



Der Zusatz von Sojaprotein zu Fleisch-Erzeugnissen ist in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit rechtlich noch nicht zulässig. Demgegenüber ist in einigen anderen EG-Ländern der beschränkte Zusatz erlaubt. Von den Staaten, die Sojaprotein-Zusätze in Fleisch-Erzeugnissen ablehnen, wird u.a. auf die Möglichkeiten der Täuschung des Verbrauchers, die Überproduktion von Fleisch in West-Europa und die Lagerbestände an Milcheiweiß, de facto: den fehlenden Bedarf an Substitutionsstoffen pflanzlichen Ursprungs, verwiesen. Daß der Täuschungsvorwurf im Falle tatsächlich ausreichender Deklaration des mitverwendeten Pflanzenproteins auch begründet wäre, wird jedoch bezweifelt. Zweifel wären allerdings dann angezeigt, wenn es im Vertrieb von losen Fleischwaren um die hinreichende Deklaration von Sojaproteinzusätzen gehen sollte. Wird der Verbraucher durch eine entsprechende Kenntlichmachung (z.B. Anschlag) im Geschäft tatsächlich in vollem Umfang über den Zusatz und die möglichen Auswirkungen von Fremdeiweißen informiert?

Im Verkehr innerhalb der EG-Mitgliedstaaten wird die Situation als besonders problematisch angesehen, weil gemäß Art. 30 des EWG-Vertrages (Urteile des Europäischen Gerichtshofes vom 20.2.1979 [120/78; ZLR 6 {1979}, 343] und vom 26.6.1980 [788/79; ZLR 7 {1980}, 482]) selbst in Verordnungen fixierte nationale Qualitätsnormen für importierte Ware dann unbeachtlich sind, wenn die gesundheitlich unbedenkliche Ware im Herkunftsland verkehrsfähig ist und Irreführungen ausgeschlossen sind. Von diesen Kriterien, die der EUGH in seiner Rechtsprechung in der Regel (siehe auch Urteile vom 5.2.1981 [53/80; ZLR 8 {1981}, 387], vom 19.2.1981 [130/80; ZLR 9 {1982}, 43] und vom 12.3.1987 [178/84; ZLR 14 {1987}, 326]) als maßgeblich ansieht, ging der Gerichtshof - entgegen dem Antrag des Generalanwalts - in seinem Urteil vom 8.11.1979 (15/79) allerdings ab (HASSOLD, 1983), indem er bei Art. 34 allein darauf abstellte, daß ein Verbot der industriellen

Bei der Herstellung von Pferdefleisch ohne Unterschied "für zur Abfuhr bestimmte Erzeugnisse und innerhalb des betreffenden Mitgliedstaates vermarktete Erzeugnisse" gilt.

Eine andere Frage ist, ob es wünschenswert wäre, die Schleusen für einen uneingeschränkten Handelsverkehr mit solchen Erzeugnissen zu öffnen, weil mit der Aufgabe des "Reinheitsgebotes" viele traditionelle Produkte verdrängt werden könnten (LINKE, 1983). Vom Lebensmittelrecht her ist einem solchen Trend jedoch kaum zu begegnen.

Im Hinblick auf die Anstrengungen, innerhalb der nächsten vier Jahre den europäischen Binnenmarkt zu vollenden, ist auch für die Bundesrepublik Deutschland in absehbarer Zeit die rechtliche Erlaubnis von Pflanzenproteinzusätzen, von denen Sojaprotein das weitaus bedeutendste ist, in Fleisch-Erzeugnissen zu erwarten. Nachdem damit auch die Importerlaubnis für Fleisch-Erzeugnisse mit Pflanzenproteinzusätzen in bestimmter Höhe verbunden sein wird, ist an der raschen Verbreitung dieser technologisch vorteilhaften und in der Herstellung z.T. preisgünstigeren Produkte kaum zu zweifeln. Es ist daher notwendig, bis zum Jahr 1992 über ein in der Routinediagnostik anwendbares Nachweisverfahren zu verfügen, das neben qualitativen auch gesicherte quantitative Aussagen über den Zusatz von Fremdeiweißen in rohen wie in erhitzten und hocherhitzten Wurstwaren ermöglicht.

Die Vielzahl, der bis in die Gegenwart in der Literatur beschriebenen serologischen und nichtserologischen Verfahren zum Fremdeiweißnachweis (2.6) ist auch ein Hinweis auf den Stellenwert, der einer zuverlässigen Routinenachweismethode beigemessen wird. Sie zeigt aber auch auf, daß bisher noch kein Verfahren gefunden wurde, das allen Anforderungen entspricht. Die Mehrzahl der vorgestellten Nachweismethoden ist ohnehin nur für qualitative Untersuchungen geeignet. Für die quantitative Bestimmung von Fremdeiweißen in erhitzten und besonders in hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen haben sich

bisher fast ausschließlich serologische Verfahren bewährt. Aber auch nicht alle serologischen Methoden sind für quantitative Messungen geeignet. Während der Immunelektrophorese übereinstimmend (ENOCH, 1967; HERRMANN u. KOTTER, 1968; GUNTHER, 1969; HERRMANN et al., 1973) allenfalls semiquantitative Eigenschaften zugebilligt werden und auch der Agar-Gel-Test gerade bei zunehmender Erhitzung des Untersuchungsmaterials nicht für quantitative Tests geeignet ist (HERRMANN et al., 1973, 1975), erfährt die Indirekte Hämagglutination unterschiedliche Bewertungen. Bereits 1966 berichten KOTTER et al. über den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in auf 115 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen mittels IH, was ENOCH (1967) und HERRMANN und KOTTER (1968) bestätigen.

KLUGE-WILM (1967) dagegen gelingt mit der IH kein genauer Nachweis von aME und auch DEGENKOLB und HINGERLE (1969) können die Ergebnisse nicht bestätigen. Sie lehnen wegen des hohen Arbeitsaufwandes und wegen der "regellosen Titerabschwächungen" und "Titererhöhungen" bei heterologem Fremdeiweiß die IH für die Routineuntersuchung sogar vollständig ab.

Diesen Auffassungen treten RING und SACHER (1984) entgegen, die eine von WAGENSTALLER (1972) vorgestellte Methode der IH überarbeiten und dabei auf mögliche Fehler bei der Durchführung hinweisen und auch Möglichkeiten zur Vermeidung dieser Fehler aufzeigen. So können sie Sojaprotein-Zusätze ab 0,5 % in Abstufungen von 1 % sicher quantitativ feststellen. Allerdings besitzt die IH trotzdem noch einige Nachteile, die sie als Methode der Wahl zum quantitativen Nachweis in Frage stellen. So ist der Arbeitsaufwand zweifellos hoch, zumal RING und SACHER zum Ausschluß von Fehlern empfehlen, für jeden Extrakt mindestens drei Verdünnungsreihen anzulegen. Außerdem lassen der hohe Verbrauch von Antiserum und nicht zuletzt die subjektive Auswertung der Ergebnisse die Suche nach einem weniger aufwendigen und zuverlässigeren Verfahren

angezeigt erscheinen.

Eine Methode, die diese Nachteile nicht mehr aufweist, könnte der von HITCHCOCK et al. (1981) in der Lebensmittelserologie erstmals eingesetzte ELISA sein. Der Arbeitsaufwand für den ELISA liegt deutlich unter dem Aufwand für die IH. Darüber hinaus ist der Serumverbrauch deutlich reduziert, da selbst mit stark verdünnten Antiseren noch sehr gute Ergebnisse erzielt werden können. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Objektivität der Ergebnisse, da diese nicht mehr subjektiv, sondern objektiv mittels Photometer ermittelt werden.

Diese Eigenschaften des ELISA - einfache Durchführbarkeit, hohe Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit und Wirtschaftlichkeit (BURRELLS und DAWSON, 1982) - belegt auch ein von OLSMAN et al. (1983) durchgeführter Ringversuch, bei dem unterschiedliche Sojaisätze in verschiedenen Proben nachzuweisen waren, wobei die beteiligten Labors mit dem ELISA - obwohl von mehr als der Hälfte der Beteiligten erstmals angewendet - übereinstimmende Ergebnisse erzielten.

RING (1987) modifizierte den indirekten ELISA und erhielt so eine auch als Screening-Test geeignete Methode, mit der er Sojaisatzzusätze zu Brühwürsten ebenfalls bereits ab 0,25 % quantitativ erfassen und differenzieren konnte. Dieses Verfahren, das auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Anwendung kam, wäre angesichts der o.a. Vorteile der ELISA-Methode auch als Routinenachweismethode für die Überwachungspraxis geeignet.

Ein genereller Nachteil serologischer Verfahren, der mit zunehmender Empfindlichkeit der Methoden immer deutlicher wird, sind die unspezifischen Reaktionen des Antiserums. Neben den spezifischen Antikörpern sind im Antiserum eine Vielzahl weiterer Antikörper und Proteine vorhanden, die das Ergebnis der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen oder verfälschen können. In der Literatur sind zu

diesem Problemfeld nur wenige Aussagen zu finden (2.7.2), allerdings sind diese Kreuzreaktionen gerade beim Einsatz der Antiseren in so sensiblen Tests wie dem ELISA durchaus zu beachten, da, wie aus den eigenen Untersuchungen ersichtlich ist, sowohl die selbstgewonnenen wie auch kommerzielle Antiseren z.T. sehr deutliche Reaktionen mit heterologen Fremdeiweißen zeigen.

Die Beobachtung, daß mit der Steigerung der Sensibilität der Nachweismethoden Kreuzreaktionen sichtbar werden, die bei weniger empfindlichen Tests noch zu vernachlässigen sind, war Anlaß zu Überlegungen, diese Reaktionen auszuschalten, um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse zu vermeiden.

MANZ (1979, 1985), dem Kreuzreaktionen bei seinen Untersuchungen zur Differenzierung der Fleischproteine verschiedener Tierarten Probleme bereiteten, erreicht eine Spezifitätssteigerung seiner Antiseren durch Absorption. Dabei gibt er dem Antiserum heterologes Vollserum bzw. verschiedene Muskelextrakte als Antigene zu, um so die kreuzreagierenden Antikörper, die mit diesen Antigenen einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden, durch anschließendes Zentrifugieren abzutrennen. Den Erfolg dieses Verfahrens überprüft er im Agar-Gel-Test, wobei beim Auftreten weiterer unspezifischer Immunpräzipitate der ganze Vorgang nochmals wiederholt wird. Diese Methode, unspezifische Antikörper durch das Angebot von Antigenen zur Immunkomplexbildung zu veranlassen und auf diese Weise auszuschalten, sicherte in der Vergangenheit eine zuverlässige Überwachungspraxis. Zwischenzeitlich ist es vergleichsweise zeit- und arbeitsintensiv und enthält außerdem einige nicht zu vernachlässigende Unsicherheitsfaktoren. So ist mit der Absonderung bestimmter kreuzreagierender Antikörper noch nicht sichergestellt, daß das Antiserum danach frei von allen unspezifisch reagierenden Antikörpern ist.

Anzumerken bleibt auch, daß ein im Rahmen der Prüfung der Absättigungsergebnisse im Agar-Gel-Test festgestelltes Aus-

bleiben von Kreuzreaktionen keine Aussage über das Ausbleiben dieser Reaktionen im leistungsfähigeren ELISA-Test zuläßt. Im Vergleich zur Reinigung des Serums durch Absorption ist die Affinitätschromatographie leistungsfähiger. Bei dieser Methode werden durch Antigene, die an das als Matrix dienende CNBr-aktivierte Sepharose-Gel gekoppelt sind, die homologen Antikörper aus dem auf die Gelsäule aufgetragenen Antiserum "herausgefangen" und reversibel gebunden. Demgegenüber werden alle anderen Serumbestandteile ausgewaschen. Die gebundenen spezifischen Antikörper werden anschließend durch eine pH-Wert-Senkung aus der Bindung gelöst und so isoliert gewonnen. Im Gegensatz zur Absorption werden bei der Affinitätschromatographie nicht die unspezifischen, sondern die spezifischen Antikörper durch die Bindung an das homologe Antigen vom Rest des Antiserums abgetrennt.

Dem Einwand, die Affinitätschromatographie erfordere mit der Vorbereitung des Gels und dem exakten Füllen der Säule im Vergleich zur Reinigung der Seren durch Absättigung insbesondere für den Routinebetrieb zu großen Aufwand, ist zu entgegnen, daß die Reinigungswirkung durch Affinitätschromatographie die gegenwärtig effektivste ist und es darüber hinaus nicht Aufgabe der ohnehin überlasteten tierärztlich geleiteten Lebensmitteluntersuchungsämter sein kann, die für den Routinebetrieb erforderlichen unterschiedlichsten Antiseren selbst zu gewinnen. Die zentrale Vergabe homologer Antiseren für die Untersuchungspraxis wurde von der Arbeitsgruppe für immunologische Lebensmitteluntersuchung in der ALTS (Arbeitsgemeinschaft leitender tierärztlicher Sachverständiger) wie auch von RING et al. (1982) bereits wiederholt angemahnt. Der schwerlich zu begründende bisherige Verzicht auf eine initiierte Gewinnung von homologen Antiseren in privat- oder öffentlich rechtlich organisierten Einrichtungen (z.B. Bundesgesundheitsamt) führt zur Vernachlässigung von durchaus angezeigten lebensmittelserologischen Untersuchungen in der Praxis, von der großen Zahl der Untersuchungen, die im Routinebetrieb mit untauglichen Seren durchgeführt werden, ganz

abgesehen.

Dem Einwand wäre aber auch entgegenzuhalten, daß sowohl das antigenbeschichtete Gel wie auch die mit Sepharose-Gel gefüllten Säulen unter NaN_3 -Zusatz nach eigener Erfahrung mindestens drei Monate ohne Beeinträchtigung der Reinigungswirkung im Kühlschrank gelagert werden können. Bei sorgfältiger Äquilibrierung und Aufbewahrung bei ca. 6°C können die Säulen außerdem ohne erkennbare Verminderung der Effektivität bis zu zehnmal verwendet werden. Die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur führt allerdings bereits in der o.a. Zeit zumindest zu einer deutlichen Abnahme des Reinigungseffektes, mitunter auch zur Wirkungslosigkeit der Säulen (Tab. 32).

Die Affinitätschromatographie hat in der Biochemie auf verschiedenen Gebieten eine weite Verbreitung mit zahlreichen Modifikationen erfahren, wie auch aus der großen Anzahl der Literatur zu entnehmen ist (z.B. CHAIKEN, WILCHEK and PARIKH, 1983). Auch in der Immunologie hat sich die Immunoaffinitätschromatographie als eigenständiges Verfahren etabliert, das erfolgreich zur Gewinnung von Antikörpern oder Antigenen aus Gemischen eingesetzt wird (KRISTIANSEN, 1978). Während auch zu diesem Themenbereich eine Vielzahl von Publikationen vorliegen, sind aus dem Bereich der Lebensmittelserologie bisher noch keine einschlägigen Untersuchungen bekannt. Um den Reinigungseffekt der Affinitätschromatographie bei Anti-Sojaprotein-Seren zu beurteilen, können deshalb nur die eigenen Ergebnisse herangezogen werden.

Bei den sieben im institutseigenen Versuchstierstall gewonnenen Anti-Sojaprotein-Seren lagen die Titerwerte gegen Sojaprotein zwischen 1:12800 und 1:29440, im Mittel bei 1:22280. Durch die affinitätschromatographische Reinigung ergab sich beim Eluat eine Titerabschwächung auf durchschnittlich 1:400 (Tab. 7). Dieser starke Titerabfall wird durch zwei Faktoren verursacht: einmal wird das Antiserum durch den Reinigungsprozeß und die nachfolgende Äquilibrierung auf das 10- bis

15fache der Ausgangsmenge verdünnt, zum anderen steht durch das Auswaschen der unspezifischen Serumproteine nur noch ein Bruchteil (ca. 1 %) der Ausgangsproteinmenge für die Reaktion mit den spezifischen Antigenen zur Verfügung. Dieser starke Titerrückgang kann allerdings durch Ankonzentrieren des Eluates weitgehend ausgeglichen werden. So wurden nach dem Ankonzentrieren mittels Mikroconcentrator-Röhrchen (amicon) gegen Sojaprotein Eluattiter von durchschnittlich 1:5150 erzielt. Der Einfluß der Reinigung auf Kreuzreaktionen läßt sich dabei an den Titerwerten der Anti-Sojaprotein-Seren gegen die Fremdeiweiße Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar vor und nach der affinitätschromatographischen Reinigung ablesen. So wurden vor der Reinigung im Durchschnitt aller sieben Antiseren ELISA-Titerwerte von 1:114 gegen Milcheiweiß, 1:504 gegen Weizenkleber und 1:895 gegen Hühnereiklar ermittelt, danach lagen die Werte bei maximal 1:1 bis 1:4 beim Eluat bzw. bei 1:1 bis 1:20 beim konzentrierten Eluat.

Dabei ist noch anzumerken, daß - wie aus den Ergebnissen ersichtlich - zwischen allen unter gleichen Bedingungen gewonnenen Antiseren z.T. erhebliche, auf das Antikörperbildungsvermögen des jeweiligen Kaninchens zurückzuführende Unterschiede auftreten können, und zwar hinsichtlich ihrer spezifischen wie auch unspezifischen Reaktionen (z.B. Serum 1 und Serum 6). Unabhängig davon führt die affinitätschromatographische Reinigung in allen Fällen zu einer deutlichen Verringerung der unspezifischen Reaktionen mit Fremdproteinen auf zu vernachlässigende Werte.

Gegen die Verwendung des Sojaproteinisolats "Isola PD" (Zusammensetzung s. 3.1) könnte eingewendet werden, daß der Einsatz dieses Produktes als Antigen zur Minderung der Spezifität der Antikörper führe. Aus früheren Versuchen, in deren Rahmen die S11- und S7-Fraktion des Sojaproteins isoliert gewonnen und als Antigen verwendet worden waren, lagen insofern Erfahrungen vor, als die Spezifitätssteigerung wie auch die Antikörperbildung insgesamt gegenüber dem o.a. Pro-

dukt als Antigen vor allem im Hinblick auf den Aufwand, der mit der Gewinnung dieser Fraktionen verbunden ist, vernachlässigt werden kann. Dies um so mehr, als die mittels "Isola PD" als Antigen gewonnenen Seren ohnehin zur chromatographischen Reinigung bestimmt waren.

Die hier angewendete Immunisierungsmethode wurde anderen Verfahren vorgezogen, da verschiedene andere Immunisierungsverfahren, z.B. die intradermale Injektion in Versuchen am Institut zwar etwas höhere Titer zeigten, von den Kaninchen aber wesentlich schlechter vertragen wurden und den Tieren offensichtlich auch Schmerzen bereiteten. Das gewählte Immunisierungsverfahren ist aber auch deshalb angezeigt, weil die erreichten Titerwerte für die beabsichtigten Untersuchungen vollauf genügten.

Mögliche Bedenken gegen die Zuverlässigkeit der angewendeten modifizierten indirekten ELISA-Methode können dahingehend entkräftet werden, als im Vorfeld der hier beschriebenen Versuche bei umfangreichen Paralleluntersuchungen mittels des modifizierten indirekten ELISA und der Sandwich-Technik jeweils einander entsprechende Ergebnisse erzielt wurden. Der Vorteil des um einen Schritt kürzeren indirekten Screening-Tests liegt dabei in der Zeit- und vor allem Materialeinsparung.

Die im Rahmen der Untersuchung des kommerziell gewonnenen Anti-Sojaprotein-Serums erzielten Ergebnisse (4.2) zeigen zwar im Vergleich mit den eigenen Seren vor der Reinigung niedrigere, aber dennoch deutliche Reaktionen mit den Fremdeiweißen. Nach der Reinigung wäre dieses Antiserum aufgrund des geringen Eluattiters zu Nachweiszwecken nicht mehr einsetzbar. Allerdings ist dabei zu bedenken, daß bei diesem kommerziellen Anti-Sojaprotein-Serum das homologe Antigen, das zur Antikörperbildung eingesetzt wurde, nicht bekannt war und die Reinigung daher an den bei den eigenen Untersuchungen eingesetzten Sojaproteinen erfolgte, was erwartungsgemäß zu

einer Verschlechterung der Reinigungswirkung führen muß. Deshalb und weil aus Kostengründen nur eine geringe Menge des kommerziellen Antiserums zur Verfügung stand, lassen sich zuverlässige Aussagen über den Nutzen der affinitätschromatographischen Reinigung von kommerziellen Anti-Sojaproteinseren nur nach umfangreicheren Untersuchungen und bei Reinigung des Antiserums an einer Säule, an die das entsprechende homologe Antigen gekoppelt ist, treffen.

Die Wirkung der affinitätschromatographischen Reinigung wird neben der Reduzierung von Kreuzreaktionen auch aus der spezifischen Antikörperaktivität ersichtlich. Einem Wert von durchschnittlich 230 bei den ungereinigten Seren steht ein Durchschnittswert von 7500 bei den gereinigten Eluaten gegenüber, was einer Anreicherung um das 32fache entspricht. Die spezifische Antikörperaktivität ist zwar starken Schwankungen ausgesetzt - so verdoppelt bzw. halbiert eine Titeränderung um eine Stufe, die bei wiederholter Untersuchung einer Probe durchaus nicht ungewöhnlich ist, den Wert der spezifischen Antikörperaktivität (SA); trotz dieser Einschränkung ist jedoch bei allen Versuchen durch die Reinigung eine deutliche Steigerung der Spezifität des Antiserums erkennbar. Die Titerausbeute, der Quotient der Gesamtantikörperaktivitäten, unterliegt aufgrund von Titeränderungen z.T. auch erheblichen Schwankungen, liegt aber im Mittel aller geprüften Eluate bei 35 %. Daraus ist ersichtlich, daß die im Eluat enthaltene Proteinmenge von nur ca. 1 % mehr als ein Drittel der gesamten Antikörperaktivität des Ausgangs-Antiserums enthält.

Auffallend ist auch die geringe Proteinausbeute des Eluats. Da dieser Wert von etwa 1,0 % der Ausgangsmenge mit Ausnahme von Serum 7 (Tab. 37) bei allen Seren nahezu gleich ist, liegt der Schluß nahe, daß tatsächlich nur 1,0 % aller im Antiserum enthaltenen Proteine spezifische Antikörper sind. Versuche, die Proteinausbeute durch die Kopplung von Sojaproteinlösungen mit 1,5, 3,0 und 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Sepharose-Gel zu erhöhen, brachten keine eindeutige Verbes-

serung gegenüber Versuchen mit 1,0 mg Sojaprotein/ml. Dem leichten Anstieg der Proteinausbeute um etwa 0,3 % und der Erhöhung des Sojaproteintiters stand eine deutliche Zunahme der Titer gegen die Fremdproteine Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar gegenüber. Eine mögliche Ursache könnte sein, daß durch das erhöhte Angebot an Antigenbindungsstellen neben den hochaffinen Antikörpern auch niederaffine gebunden und somit nicht ausgewaschen werden. Diese Antikörper reagieren im ELISA aufgrund ihrer geringeren Spezifität sowohl mit dem Sojaprotein als auch mit den Fremdproteinen. Aus diesen Gründen ist die Kopplung einer Sojaproteinlösung mit 1,0 mg Protein/ml vorrangig geeignet, hochspezifische Antikörper möglichst rein zu gewinnen.

Die Reinigung und die damit verbundene Verdünnung des Antiserums haben keine Reduzierung der Nachweisfähigkeit gegenüber Sojaprotein in erhitzten und hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen zur Folge. In Brühwürsten konnten dabei sowohl mit dem konzentrierten als auch mit dem stark verdünnten Eluat Sojaproteinzusätze von 0,25 bis 2,0 % quantitativ erfaßt und eindeutig differenziert werden. In hocherhitzten Produkten waren Sojaproteinzusätze ab 0,25 % ebenfalls nachweisbar. Demgegenüber war eine Differenzierung zwischen Sojaproteinzusätzen von 0,5 und 1,0 % in den hocherhitzten Brühwürsten gleicher Produktion nicht möglich. Dies hatte zahlreiche Wiederholungsuntersuchungen zur Folge. Dabei waren jedoch die Extinktionswerte für beide Proben immer weitgehend identisch. Die Vermutung liegt nahe, daß die nicht mögliche Differenzierung nicht dem Antiserum anzulasten ist, sondern daß im Rahmen der Herstellung durch nicht homogene Vermischung oder durch fehlerhafte Beschriftung der Modellwürste bereits eine Verwechslung erfolgte und beide Proben tatsächlich gleiche Mengen an Sojaproteinzusätzen enthalten.

Trotz der dargestellten Verbesserungen bleibt zu klären, inwieweit das vorgestellte Verfahren durch erhöhte Automation noch effizienter werden könnte. So würde z.B. der Einsatz

einer automatischen Pumpe einen gleichmäßigeren Durchfluß gewährleisten und der Einsatz von Fraktionssammlern mit nachgeschaltetem Photometer die sofortige Proteingehaltsbestimmung ermöglichen, wodurch auch das optimale Eluatvolumen genau zu ermitteln wäre. Nicht verfügbare finanzielle Mittel setzten hier Grenzen.

In Anbetracht der Forderungen, die an eine Methode zum Nachweis von Sojaprotein in Fleisch-Erzeugnissen zu stellen sind, ist die Kombination Affinitätschromatographie und ELISA für zuverlässige Tests angezeigt. Im Vergleich zu den bisher üblichen Verfahren hält sich der Arbeitsaufwand derart in Grenzen, daß angesichts der aufgezeigten Resultate auch der Einsatz in der Routinediagnostik zu fordern ist, zumal sowohl das gekoppelte Gel als auch das gereinigte Serum auf Vorrat hergestellt werden können und der Serumverbrauch äußerst gering ist. Die Untersuchungen mittels der modifizierten indirekten ELISA-Methode (RING, 1987) sind einfach und rasch in großer Zahl durchzuführen. Die Ergebnisse dieses sensiblen Tests sind - anders als bei der Indirekten Hämagglutination - objektiv erfaßbar, reproduzierbar und nicht zuletzt dadurch zuverlässig.

Serologische Verfahren sind vor allem zum quantitativen Nachweis von Fremdproteinen in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen anderen Verfahren überlegen. Insbesondere bei hochempfindlichen Methoden wie dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) werden die Ergebnisse durch die Neigung der Antiseren zu Kreuzreaktionen mit unspezifischen Proteinen mitunter aber erheblich beeinträchtigt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zu prüfen, ob die in der Biochemie zu Reinigungszwecken erfolgreich eingesetzte Affinitätschromatographie auch in der Lebensmittelserologie geeignet ist, Kreuzreaktionen auszuschalten und die Spezifität von Anti-Sojaprotein-Seren zu steigern.

Das erarbeitete Verfahren wird von der Vorbereitung des Gels und der Kopplung des Antigens über das Füllen der Säulen bis zur Reinigung der Antiseren ausführlich beschrieben.

Bei der Untersuchung von sieben selbstgewonnenen Anti-Sojaprotein-Seren wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die ELISA-Titer der Sojaprotein-Antiseren gegen die Fremdproteine Milcheiweiß, Weizenkleber und Hühnereiklar konnten von 1:114, 1:504 und 1:895 mittels Reinigung auf Werte von 1:1 bis 1:4 bzw. 1:5 bis 1:20 bei ankonzentriertem Eluat reduziert werden. Der Titer gegen Sojaprotein sank dabei von durchschnittlich 1:22280 auf 1:400 bzw. 1:5150.

Die spezifische Antikörperaktivität stieg von durchschnittlich 230 auf 7500 an, was einer Anreicherung um das 32fache entspricht. Die Proteinausbeute betrug etwa 1 %. Das bedeutet, daß aus 1 ml Antiserum durch die Reinigung ca. 1 mg spezifische Antikörper gewonnen werden konnten. Die Titerausbeute (Titer x Volumen) lag bei 35 %.

Der Nachweis von Sojaproteinzusätzen von 0,25 % bis 2,0 % zu Brühwürsten (auf 72 °C erhitzt) und Dosenwürsten (auf 116 °C erhitzt) war mit den gereinigten Antiseren jederzeit problemlos möglich.

Die Kombination von Affinitätschromatographie und ELISA ist ein zuverlässiges und leicht zu handhabendes Verfahren zum quantitativen Nachweis von Sojaproteinzusätzen zu Fleisch-Erzeugnissen, das auch für den Nachweis anderer Fremdproteine geeignet erscheint.

SUMMARY**Affinity chromatographic purification of anti-soy protein sera**

Serological methods are superior to other methods for quantitative determination of foreign proteins in heated meat products. But especially in high sensitive methods like the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) the results are affected by the tendency of the antisera to cross-reactions with other proteins.

The aim of this work was to test whether affinity chromatography, a successful purification method in biochemistry, is also suitable in food serology to eliminate cross-reactions and to increase the specificity of the anti-soy protein sera.

The acquired method is described in detail from preparing of the Sepharose-gel and coupling of the antigens to the filling of the columns and the purification of the antisera.

In the examination of seven self-made anti-soy protein sera the following results were obtained:

The ELISA-titer of the soyprotein antisera against the foreign proteins milk protein, wheat protein and egg protein could be reduced by purification from 1:114, 1:504 and 1:895 to 1:1 to 1:4 respectively 1:5 to 1:20 by concentration of the eluat. The titer against soy protein sank from 1:22280 to 1:400 respectively 1:5150 in average.

The specific antibody activity raised from 230 to 7500 in average. That means an enrichment for the 32 fold. The yield of protein was about 1 %. This means that you could get 1 mg of specific antibodies out of 1 ml of antiserum by purification. The yield of titer (titer x volume) was 35 %.

The determination of soy protein admixtures from 0,25 % to 2,0 % in "Brühwurst" (heated to 72 °C) and canned meat (heated to 116 °C) was possible with the purified antisera without problems.

The combination of affinity chromatography and ELISA is a sure and easy to handle procedure for quantitative determination of soy protein admixtures in meat products that also could be suitable for the determination of other foreign proteins.

Tab. 9: Serum 1: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei Auftrag unterschiedlicher Serumvolumina auf der Kapillarsäule

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 1	1,0 ml	76,0	76,0	1:1280	17			
Eluat	20,0 ml	0,03	0,6	1:20	667	39fach	31 %	0,8 %
Serum 1	2,0 ml	90,0	180,0	1:12800	142			
Eluat	21,0 ml	0,05	1,1	1:740	14800	104fach	61 %	0,6 %
Serum 1	1,5 ml		135,0					
Eluat	21,0 ml	0,05	1,1	1:490	9800	69fach	54 %	0,8 %
Serum 1	1,0 ml		90,0					
Eluat	21,0 ml	0,04	0,8	1:700	17500	123fach	115 %	0,9 %
Serum 1	0,5 ml		45,0					
Eluat	21,0 ml	0,03	0,6	1:460	15333	108fach	151 %	1,3 %

Tab. 10: Serum 1: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 1,5 ml Serumauflauf auf der Kapillarsäule

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 1	1,5 ml	89,0	135,0	1:25600	288			
Eluat	11,0 ml	0,06	0,7	1:640	10667	37fach	18 %	0,5 %
Serum 1	1,5 ml	89,0	135,5	1:25600	288			
Eluat	11,5 ml	0,07	0,8	1:640	9143	32fach	19 %	0,6 %
Serum 1	1,5 ml	74,0	111,0	1:25600	346			
Eluat	12,0 ml	0,04	0,5	1:640	16000	46fach	20 %	0,5 %
Serum 1	1,5 ml	74,0	111,0	1:25600	346			
Eluat	13,0 ml	0,02	0,3	1:120	6000	17fach	4 %	0,3 %
Serum 1	1,5 ml	65,0	97,5	1:25600	394			
Eluat	19,0 ml	0,03	0,6	1:160	5333	14fach	8 %	0,6 %

Tab. 11: Serum 1: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 1,5 ml Serumauftrag auf der Kapillarsäule und 25 ml auf der Säule C26/40

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 1	1,5 ml	65,0	97,5	1:25600	394			
Eluat	20,5 ml	0,03	0,6	1:80	2667	7fach	4 %	0,6 %
Eluat (konz.)	1,0 ml	0,6	0,6	1:6400	10667	27fach	17 %	0,6 %
Auftrag: 25 ml Säule C26/40								
Serum 1	25,0 ml	65,0	1625,0	1:25600	394			
Eluat	380 ml	0,06	23,0	1:800	1333	34fach	48 %	1,4 %
Eluat (konz.)	17,0 ml	1,35	23,0	1:12800	9481	24fach	34 %	1,4 %
				1:6400	4741	12fach	17 %	

Tab. 12: Serum 1: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei 0,5 und 1,0 ml Serumauflage

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnerei-Klar-Titer		
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Serum	Eluat	Eluat
a) Auftrag: 0,5 ml Serum											
1:6400	1:320	1:256	-								
	1:800										
1:6400	1:400	1:32	-								
1:12800	1:320			1:128	-						
b) Auftrag: 1,0 ml Serum											
1:1280	1:20	1:10	1:1								
1:6400	1:1280	1:256	-								
	1:800										
1:6400	1:400	1:32									
1:12800	1:320			1:128	-						
1:12800	1:40				-			1:160	-		

Tab. 13: Serum 1: ELISA-Titer gegen Sojaseiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 1,5 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer		Milchseiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
c) Auftrag: 1,5 ml Serum							
1:6400	1:640	1:256	1:2				
	1:800						
1:6400	1:200	1:32	1:2				
1:16384	1:256						
1:6400	1:200			1:8	-		
1:12800	1:320			1:128	-		
1:4800	1:80			1:10	-	1:128	-
1:12800	1:80			1:20	-	1:160	-
1:12800	1:640					1:320	1:2
1:12800	1:640	1:160	1:2	1:320	-	1:320	1:2
1:25600	1:640	1:160	1:2	1:640	1:2	1:320	1:2
1:12800	1:640	1:20	1:2	1:160	1:2	1:320	1:2
1:25600	1:80	1:160	1:2	1:320	-	1:320	-

Tab. 14: Serum 1: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 1,5 und 25 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnereiklar-Titer		
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Serum	Eluat	Eluat
1:25600	1:20										
	1:40										
	1:320										
	1:640										
	1:160										
	1:160										
1:25600	1:160	1:80	1:2	1:160	1:2	1:320	1:2	1:320	1:2	1:2	
1:25600	1:640	1:20	1:2			1:320		1:320	1:8		
1:25600	1:160	1:10	1:2	1:20	1:4						
	1:40		-		-						
1:12800	1:160	1:10	1:2	1:160	1:8	1:320	1:8	1:320	1:8		
1:25600	1:80	1:20	-	1:160	-	1:160	-	1:160	-		
	1:800c.		-		-						
Auftrag 25 ml											
1:12800	1:800	1:40	1:2	1:160	1:2	1:160	1:2	1:160	1:2	1:2	
	1:12800c.		1:4							1:12	

Tab. 15: Serum 1: ELISA-Titer gegen Sojaprotein, Weizenkleber und Hühnereiklar bei 25, 1,5 und 2,0 ml Serumauflage

Sojaprotein-Titer		Milchprotein-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
Auftrag: 25 ml							
1:25600	1:800	1:40	1:2	1:160	1:4	1:160	1:4
-----	1:6400c.		1:10		1:16		1:16
1:6400	1:6400c.	1:100	-	1:10	1:20	1:100	-
	1:6400c.		-		-		-
	1:6400c.		-		-		-
	1:400c.		-		-		1:5
	1:400c.		-		-		-
	1:200c.		-		-		-
d) Auftrag: 2,0 ml							
1:6400	1:1600	1:256	1:2				
	1:640						
1:6400	1:400	1:32	1:2				
1:12800	1:320			1:128	-		

Tab. 16: Serum 2: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei unterschiedlichen Serumvolumina auf der Kapillarsäule

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 2	2,0 ml	93,0	186,0	1:5120	55			
Eluat	18,0 ml	0,09	1,6	1:320	3556	65fach	56 %	0,9 %
Serum 2	2,0 ml	93,0	186,0	1:5120	55			
Eluat	19,0 ml	0,08	1,5	1:320	4000	73fach	59 %	0,8 %
Serum 2	1,0 ml	96,0	96,0	1:2560	27			
Eluat	20,0 ml	0,04	0,8	1:40	1000	37fach	31 %	0,8 %
Serum 2	0,5 ml	96,0	48,0	1:2560	27			
Eluat	21,0 ml	0,03	0,6	1:40	1333	49fach	33 %	1,3 %
Serum 2	1,0 ml	95,0	95,0	1:2560	27			
Eluat	20,0 ml	0,04	0,8	1:40	1000	37fach	31 %	0,8 %

Tab. 17: Serum 2: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei unterschiedlichen Serumvolumina auf der Kapillarsäule

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 2	2,0 ml	100,0	200,0	1:12800	128			
Eluat	20,0 ml	0,05	1,0	1:230	4600	36fach	18 %	0,5 %
Serum 2	1,5 ml		150,0					
Eluat	20,0 ml	0,04	0,8	1:230	5750	45fach	24 %	0,5 %
Serum 2	1,0 ml		100,0					
Eluat	23,0 ml	0,03	0,7	1:190	6333	49fach	34 %	0,7 %
Serum 2	0,5 ml		50,0					
Eluat	23,0 ml	0,03	0,7	1:110	3667	29fach	40 %	1,4 %
Serum 2	1,5 ml	80,0	120,0	1:25600	320			
Eluat	11,0 ml	0,1	1,1	1:600	6000	19fach	17 %	0,9 %

Tab. 18: Serum 2: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 1,5 ml Serumaufrag auf der Kapillarsäule

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 2	1,5 ml	80,0	120,0	1:25600	320			
Eluat	11,0 ml	0,17	1,9	1:1280	7530	24fach	37 %	1,6 %
Serum 2	1,5 ml	95,0	142,5	1:25600	269			
Eluat	12,0 ml	0,04	0,5	1:240	6000	22fach	8 %	0,4 %
Eluat	13,5 ml	0,05	0,7	1:480	9600	36fach	17 %	0,5 %
Serum 2	1,5 ml	108,0	162,0	1:25600	237			
Eluat	23,0 ml	0,03	0,7	1:220	7333	31fach	13 %	0,4 %
Eluat	20,0 ml	0,03	0,6	1:160	5333	22fach	8 %	0,4 %
Eluat	1,0 ml	0,7	0,7	1:6400	9143	39fach	17 %	0,4 %
(konz.)								
				1:3200	4571	19fach	8 %	
				1:1600	2286	10fach	4 %	
				1:400	571	2fach	1 %	

Tab. 19: Serum 2: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 0,5 und 1,0 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer		Milcheiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnerei-klar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
a) Auftrag: 0,5 ml Serum							
1:2560	1:40	1:32	-				
1:5120	1:64						
1:5120	1:128	1:256	1:2				
1:5120	1:160						
1:12800	1:100						
b) Auftrag: 1,0 ml Serum							
1:2560	1:40						
1:2560	1:128	1:64	1:1				
1:5120	1:256						
1:5120	1:256	1:256	1:2				
1:5120	1:160						
1:12800	1:100						

Tab. 20: Serum 2: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 1,0 und 1,5 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnereiklar-Titer		
Serum	Eluat		Serum	Eluat		Serum	Eluat		Serum	Eluat	
1:19200	1:80					1:40	-				
	1:160						-				
c) Auftrag: 1,5 ml Serum											
1:2560	1:256		1:64	1:2							
1:5120	1:128										
1:5120	1:512		1:256	1:2							
1:5120	1:160										
1:12800	1:100										
1:12800	1:200										
1:32768	1:256										
1:12800	1:160					1:256	1:4				
1:19200	1:40					1:40	-				
						1:256	1:2		1:256	1:2	
1:12800	1:80					1:80	-		1:640	-	

Tab. 21: Serum 2: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei
1,5 ml Serumauflauf

Sojaprotein-Titer		Milcheiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiweiß-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
1:25600	1:640	1:320	1:2	1:640	1:8	1:640	1:4
1:25600	1:1280	1:640	1:4	1:320	1:8	1:640	1:4
1:25600	1:320	1:160	1:2	1:640	1:2	1:640	1:2
1:25600	1:640	1:320	1:2	1:640	1:4	1:640	1:4
1:25600	1:160						
	1:160						
	1:320						
	1:320						
	1:80						
	1:640						
1:25600	1:320	1:320	1:2	1:640	1:2	1:640	1:2
1:25600	1:320	1:160	1:2			1:1280	1:4
1:51200	1:320	1:10	1:2	1:320	1:4		
	1:160		1:2		1:2		

Tab. 22: Serum 2: ELISA-Titer gegen Sojaprotein und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 1,5 und 2,0 ml Serumauflage

Sojaprotein-Titer		Milchprotein-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
1:25600	1:160	1:320	1:2	1:640	1:4	1:1280	1:4
1:25600	1:160	1:320	-	1:640	1:2	1:1280	-
	1:1600c.		-		1:2		-
1:12800	1:12800c.	1:200	-	1:80	1:8	1:400	1:10
	1:6400c.		-		1:10		-
	1:3200c.		-		-		-
	1:400c.		-		1:5		1:5
	1:400c.		-		1:10		-
	1:400c.		-		-		-
1:51200		1:640		1:1280		1:2560	

d) Auftrag: 2,0 ml Serum

1:5120	1:256	
1:5120	1:320	1:20
		1:1

Tab. 23: Serum 2: ELISA-Titer gegen Sojaprotein, Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei 2,0 ml Serumauflage

Sojaprotein-Titer		Milcheiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiweiß-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
1:2560	1:256	1:64	1:2				
1:5120	1:128						
1:5120	1:512	1:256	1:2				
1:5120	1:160						
1:12800	1:100						
1:12800	1:160			1:80	-	1:640	-

Tab. 24: Serum 3: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 25 ml Serumaufrag auf der Säule C26/40

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 3	25 ml	89,0	2225,0	1:29090	327			
Eluat	520 ml	0,05	26,0	1:400	8000	24fach	29 %	1,2 %
				1:200	4000	12fach	14 %	
Eluat (konz.)	37 ml	0,7	26,0	1:12800	18286	56fach	65 %	1,2 %
				1:6400	9143	28fach	33 %	
				1:3200	4572	14fach	16 %	
				1:1600	2286	7fach	8 %	
				1:800	1143	3fach	4 %	

Tab. 25: Serum 3: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Poteinausbeute bei 2,0 ml Serumaufrag auf der Kapillarsäule, bei Kopplung einer Lösung von 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 3	2,0 ml	86,0	172,0	1:29090	338			
Eluat	25,0 ml	0,1	2,5	1:800	8000	24fach	34 %	1,5 %
				1:400	4000	12fach	17 %	
Eluat (konz.)	3,5 ml	0,6	2,1	1:6400	10667	32fach	38 %	1,2 %
				1:3200	5333	16fach	19 %	

Tab. 26: Serum 3: ELISA-Titer gegen Sojaprotein und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei
25 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer		Milchprotein-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
1:12800		1:40		1:80		1:1280	
1:25600	1:200	1:160	-	1:320	1:2	1:1280	1:2
	1:1600c.		-		1:10		-
	1:12800c.		-		1:10		1:20
1:25600	1:400	1:160	-	1:1280	-	1:1280	-
	1:12800c.		-		1:5		1:20
	1:12800c.		1:5		1:5		1:40
1:51200	1:3200c.	1:160	-	1:160	-	1:2560	1:10
	1:6400c.		-		1:10		1:10
1:51200	1:1600c.	1:160	-	1:80	-	1:1280	-
	1:1600c.		1:10		-		-
1:25600		1:160		1:160		1:1280	
	1:800c.		-		1:10		1:10
	1:1600c.		-		-		-
1:64000	1:1600c.	1:160	-	1:160	-	1:1280	-

Tab. 27: Serum 3: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluat bei
Kopplung einer Lösung von 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnereiklar-Titer		
Serum	Eluat		Serum	Eluat		Serum	Eluat		Serum	Eluat	
1:12800	1:800		1:10	1:5		1:320	1:5		1:640	1:10	
	1:6400c.			1:10			1:10			1:20	
1:12800	1:400		1:10	1:10		1:640	1:10		1:2560	1:10	
	1:3200c.			1:10			1:20			1:20	
1:12800			1:40	1:10		1:320	1:10		1:1280	1:20	
	1:6400c.			1:20			1:40			1:160	
1:25600	1:400		1:160	1:10		1:1280	1:40		1:2560	1:20	
	1:6400c.			1:20			1:40			1:40	

Tab. 28: Serum 4: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 25 ml Serumaufrag auf der Säule C26/40

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 4	25 ml	119,0	2975,0	1:23770	200			
Eluat	500 ml	0,05	25,0	1:200	4000	20fach	17 %	0,8 %
Eluat (konz.)	35 ml	0,7	24,5	1:1600	2286	11fach	9 %	0,8 %
				1:800	1143	6fach	5 %	
				1:400	571	3fach	2 %	

Tab. 29: Serum 4: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei
25 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnereiweiß-Titer		
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Serum	Eluat	Eluat
1:12800		1:160		1:80		1:640		1:1280			
1:25600	1:200	1:20	-	1:1280	1:2	1:1280	1:2	1:1280	1:2	1:2	1:2
	1:400c.		-		-		-			-	-
	1:1600c.		-		-		-			1:10	1:10
	1:800c.		-		-		-			1:10	1:10
1:25600	1:200	1:40	-	1:1280	-	1:1280	-	1:1280	-	-	-
	1:1600c.		-		-		1:10		1:20		
1:25600	1:200	1:80	-	1:640	-	1:640	-	1:2560	1:10	1:10	1:10
	1:1600c.		-		-		1:10		1:10		
1:51200	1:1600c.	1:40	-	1:320	-	1:320	-	1:2560	1:10	1:10	1:10
1:12800	1:200	1:20	-	1:1280	1:2	1:1280	1:2	1:1280	1:2	1:2	1:2
	1:400c.		-		-		-			-	-
1:12800		1:40		1:1280		1:1280		1:2560		-	-
	1:400c.		-		-		-			-	-
	1:400c.		-		-		-			-	-

Tab. 30: Serum 5: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Poteinausbeute bei 30 ml Serumauflauf auf der Säule C26/40

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 5	30 ml	137,0	4110,0	1:29440	215			
Eluat	550 ml	0,06	33,0	1:400	6667	31fach	25 %	0,8 %
				1:100	1667	8fach	6 %	
Eluat (konz.)	27 ml	1,2	32,4	1:6400	5333	25fach	20 %	0,8 %
				1:3200	2667	12fach	10 %	
				1:1600	1333	6fach	5 %	

Tab. 31: Serum 5: ELISA-Titer gegen Sojaprotein und Fremdproteine von Serum und Eluat bei
30 ml Serumaufrag

Sojaprotein-Titer		Milchprotein-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
1:51200	1:400	1:160	1:2	1:2560	1:2	1:2560	1:2
	1:6400c.		1:4		1:8		1:16
1:25600	1:100	1:40	-	1:1280	1:5		
	1:3200c.		1:5		1:10		
1:25600	1:1600c.	1:160	1:5	1:640	1:10	1:1280	1:10
1:12800	1:1600c.	1:80	-	1:320	1:5	1:640	1:5
	1:3200c.		1:5		1:10		1:10
1:32000	1:6400c.						

Tab. 32: Serum 6: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 35 ml (frisches Gel, alte (EL_K 1) und neue (EL_K 2) Filter) und 30 ml (altes Gel) Serumauflauftrag

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICH- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
a) Sojaproteinlösung 1,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 6	35 ml	122,0	4270,0	1:28800	236			
Eluat	450 ml	0,08	36,0	1:800	10000	42fach	36 %	0,8 %
				1:400	5000	21fach	18 %	
Eluat (konz.1)	115 ml	0,3	34,5	1:6400	21333	90fach	73 %	0,8 %
Eluat (konz.2)	30 ml	1,2	36,0	1:12800	10667	45fach	38 %	0,8 %
Serum 6	30 ml	100,0	3000,0	1:28800	288			
Eluat	360 ml	0,02	7,2	1:50	2500	9fach	2 %	0,2 %
Eluat (konz.1)	11 ml	0,6	6,6	1:400	667	2fach	1 %	0,2 %

Tab. 33: Serum 6: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 15 ml (altes Gel) Serumaufrag auf der Säule C26/40 und 2,0 ml auf der Kapillarsäule bei Kopplung einer Lösung von 1,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
Serum 6	15 ml	100,0	1500,0	1:28800	288			
Eluat	200 ml	0,01	2,0	1:50	5000	17fach	2 %	0,1 %
Eluat (konz.)	10 ml	0,2	2,0	1:3200	16000	56fach	7 %	0,1 %
b) Sojaproteinlösung 1,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 6	2,0 ml	100,0	200,0	1:28800	288			
Eluat	22,0 ml	0,06	1,3	1:800	13333	46fach	31 %	0,7 %
Eluat (konz.)	1,5 ml	0,9	1,3	1:12800	14222	49fach	33 %	0,7 %

Tab. 34: Serum 6: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 2,0 ml Serumauflauf auf der Kapillarsäule, bei Kopplung von 3,0 und 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
c) Sojaproteinlösung 3,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 6	2,0 ml	100,0	200,0	1:28800	288			
Eluat	23,0 ml	0,11	2,5	1:800	7273	25fach	32 %	1,3 %
Eluat (konz.)	1,3 ml	1,9	2,5	1:12800	6737	23fach	29 %	1,3 %
d) Sojaproteinlösung 3,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 6	2,0 ml	100,0	200,0	1:28800	288			
Eluat	25,0 ml	0,08	2,0	1:800	10000	35fach	35 %	1,0 %
Eluat (konz.)	1,5 ml	1,3	2,0	1:12800	9846	34fach	33 %	1,0 %

Tab. 35: Serum 6: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei 30, 15 und 35 ml Serumauflauf und bei Kopplung von 1,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

Sojaprotein-Titer		Milcheiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiweiß-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
a) Sojaproteinlösung 1,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel							
1:25600	1:50	1:80	-	1:80	-	1:160	-
	1:400c.		-		1:10		-
1:25600	1:50	1:80	-	1:80	-	1:160	-
	1:3200c.		-		-		-
1:51200	1:800	1:80	1:10	1:160	-	1:160	1:10
	1:6400c.		1:20		1:20		1:20
1:25600	1:400	1:40	-	1:80	-	1:160	1:10
	1:6400c.		1:10		1:10		1:20
	1:12800c.		1:10		1:10		1:20
b) Sojaproteinlösung 1,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel							
1:12800	1:800	1:40	-	1:80	1:10	1:80	1:10
	1:12800c.		1:80		1:80		1:80
	1:12800c.		1:40		1:80		1:80

Tab. 36: Serum 6: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei Kopplung von 3,0 und 3,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

Sojaprotein-Titer		Milcheiweiß-Titer		Weizenkleber-Titer		Hühnereiklar-Titer	
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat
c) Sojaproteinlösung 3,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel							
1:25600	1:800	1:40	1:10	1:80	1:10	1:80	1:10
	1:12800c.		1:160		1:160		1:160
	1:12800c.		1:40		1:80		1:80
	1:12800c.		1:20		1:20		1:40
d) Sojaproteinlösung 3,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel							
1:25600	1:800	1:40	-	1:80	-	1:80	-
	1:12800c.		1:40		1:40		1:80
1:25600	1:800	1:80	-	1:80	1:10	1:160	1:10
	1:12800c.		1:80		1:80		1:160

Tab. 37: Serum 7: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 15 ml Serumauflauf auf der Säule C26/40 und 2,0 ml auf der Kapillarsäule bei Kopplung von 1,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
a) Sojaproteinlösung 1,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 7	15 ml	42,0	630,0	1:12800	305			
Eluat	205 ml	0,18	37,0	1:640	3556	12fach	68 %	5,9 %
Eluat (konz.)	42 ml	0,8	34,0	1:6400	8000	26fach	140 %	5,4 %
b) Sojaproteinlösung 1,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 7	2,0 ml	40,0	80,0	1:12800	320			
Eluat	25,0 ml	0,05	1,3	1:400	8000	25fach	39 %	1,6 %
Eluat (konz.)	3,5 ml	0,3	1,1	1:12800	42667	133fach	175 %	1,4 %
				1:3200	10667	33fach	44 %	
				1:800	2667	8fach	11 %	

Tab. 38: Serum 7: Proteingehalt, spez. Aktivität, Titer- und Proteinausbeute bei 2,0 ml Serumauflauf auf der Kapillarsäule bei Kopplung von 3,0 mg Sojaprotein/ml an das Gel

SERUM	VOLUMEN	PROTEIN (mg/ml)	GESAMTPRO- TEINGEHALT (mg)	ELISA- TITER	SPEZIF. AKTIVITÄT	ANREICHE- RUNG	TITER- AUSBEUTE	PROTEIN- AUSBEUTE
c) Sojaproteinlösung 3,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel								
Serum 7	2,0 ml	40,0	80,0	1:12800	320			
Eluat	25,0 ml	0,03	0,75	1:400	13333	42fach	39 %	0,9 %
Eluat (konz.)	2,0 ml	0,3	0,6	1:12800	42667	133fach	100 %	0,8 %
				1:800	2667	8fach	6 %	
				1:400	1333	4fach	3 %	

Tab. 39: Serum 7: ELISA-Titer gegen Sojaweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei 15 ml Serumauflage und bei Kopplung von 1,5 mg Sojaprotein/ml an das Gel

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnereiklar-Titer		
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Serum	Eluat	Eluat
a) Sojaproteinlösung 1,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel											
1:25600	1:640	1:100	-	1:50	1:5	1:200	1:5	1:200		1:5	
	1:6400c.		1:10		1:20					1:20	
b) Sojaproteinlösung 1,5 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel											
1:12800	1:400	1:80	-	1:160	1:10	1:160	1:10	1:160		-	
	1:400		-		-		-			-	
	1:3200c.		-		1:10		1:10			-	
1:6400	1:400	1:160	1:5	1:320	1:5		1:5	1:320			
	1:3200c.		1:5								
1:6400	1:400	1:80	-	1:160	-		-	1:160		-	
1:12800	1:400	1:160	-	1:320	-		-	1:320		-	
	1:12800c.		1:80		1:40		1:40			1:80	
1:12800	1:400	1:160	-		1:10		1:10			-	
	1:800c.		-		-		-			-	

Tab. 40: Serum 7: ELISA-Titer gegen Sojaeiweiß und Fremdproteine von Serum und Eluaten bei Kopplung von 3,0 mg Sojaprotein/ml an das Gel

Sojaprotein-Titer			Milcheiweiß-Titer			Weizenkleber-Titer			Hühnerei-klar-Titer		
Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Eluat	Serum	Serum	Eluat	Eluat
c) Sojaproteinlösung 3,0 mg/ml gekoppelt an Sepharose-Gel											
1:12800	1:400	1:80	-	1:160	1:10	1:80	-	-	-	-	-
	1:400		-		-		-	-	-	-	-
	1:800c.		-		-		-	-	-	-	-
1:6400	1:400	1:160	1:5	1:320	1:5	1:320	1:5	1:320	1:5	1:5	1:5
	1:800c.		1:5		-		-		-	-	-
1:6400	1:400	1:80	-	1:160	-	1:160	-	1:160	-	-	-
1:12800		1:160	-	1:320	-	1:320	-	1:320	-	-	-
	1:12800c.		1:80		1:80		1:80		1:160	1:160	1:160
1:12800	1:400	1:160	-	1:640	1:20	1:320	1:10	1:320	1:10	1:10	1:10
	1:400c.		-		1:20		1:20		-	-	-

Axen, R., J. Porath and S. Ernback (1967):

Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.

Nature 214, 1302

Bailey, F.J. (1976):

A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis.

J. Sci. Fd. Agric. 27, 827

Baudner, S. (1978):

Immunologische Lebensmittelanalytik.

Getreide, Mehl, Brot 32, 330

Bier, O.G., W.D. da Silva, D. Götze und J. Mota (1979):

Experimentelle und Klinische Immunologie.

Springer-Verlag, Berlin

Bier, O.G., W.D. da Silva, D. Götze and I. Mota (1986):

Fundamentals of Immunology.

2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

Biermann, A. und G. Terplan (1983):

Erfahrungen mit einem Mikro-ELISA zur Aflatoxin B₁-Bestimmung in Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 17

Boyden, S.V. (1951):

The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein in sera.

J. exper. Med. 93, 107

Brincker, A. (1979):

Review of European legislation on vegetable protein in meat products.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 56, 211

Burrells, C. and A.McL. Dawson (1982):

ELISA methodology: Variations in technical procedures.

In: **Wardley, R.C., J.R. Crowther** (ed.): The ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay in veterinary research and diagnosis.

Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 1

Campbell, M.F. (1981):

Processing and product characteristics for textured soy flours, concentrates and isolates.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 58, 336

Campbell, D.H., E. Luescher and L.S. Lerman (1951):

Immunologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen.

Proc. nat. Acad. Sci. U.S. 37, 575

Campbell, G.S., R.P. Mageau, B. Schwab and R.W. Johnston (1984):

Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive Enzyme-linked Immunoassay.

Antimicrob. Agents Chemother. 25, 205

Chaiken, J.M., M. Wilchek and I. Parikh (1983):

Affinity chromatography and biological recognition.

Academic Press, Orlando

Chu, Y.-S. (1981):

Soybean protein food in China.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 58, 96A

Circle, S.J. (1974):

Soy proteins in dairy-type foods, beverages, confections, dietary and other foods.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 51, 198A

Claus, W.S. (1974):

Soy products in other applications.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 51, 197A

Coomaraswamy, M. and F.O. Flint (1973):

The histochemical detection of soya "novel proteins" in comminuted meat products.

Analyst 98, 542

Crignis, G.S. de (1986):

Immunologischer Nachweis von Sojaprotein mit Antikörpern aus Kolostrum.

Diss.rer.nat., München-Weihenstephan

Crosson, F.J.Jr., J.A. Winkelstein and E.R. Moxon (1978):

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection and quantitation of capsular antigen of Haemophilus influenzae type b.

Infect. Immun. 22, 617

Cuatrecasas, P. (1970):

Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads.

J. biol. Chem. 245, 3059

Cuatrecasas, P., M. Wilchek and Ch.B. Anfinsen (1968):

Selective enzyme purification by affinity chromatography.

Proc. nat. Acad. Sci. U.S. 61, 636

Czaja, A.Th. (1965):

Polarisationsoptischer Nachweis von Soja- und Süßlupinenmehl.

Z. Lebensmitt.-Untersuch. 127, 17

Darcy, D.A. (1960):

A quantitative application of the agar diffusion plate: The estimation of specific proteins in serum.

Immunology 3, 325

Degenkolb, E. und M. Hingerle (1967):

Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 241

Degenkolb, E. und M. Hingerle (1969):

Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 73

Dobrowolska, G., E. Ber und G. Muszynska (1986):

Separation and purification of maize casein kinases by affinity chromatography.

J. Chromat. 376, 421

Donachie, W. and G.E. Jones (1982):

The use of ELISA to detect antibodies to Pasteurella haemolytica A2 and Mycoplasma ovipneumoniae in sheep with experimental chronic pneumonia.

In: **Wardley, R.C., J.R. Crowther** (ed.): The ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay in veterinary research and diagnosis.

Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 102

Ebert, U. (1982):

Enzymserologische (ELISA) Untersuchungen zum Nachweis zirkulierenden Babesienantigens.

Diss.med.vet., München

Eldridge, A.C. (1981):

Determination of soya protein in processed foods.

J. Am. Oil Chemists' Soc. 58, 483

Eldridge, A.C., L.T. Black and W.J. Wolf (1979):

Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates and isolates.

J. Agric. Ed. Chem. 27, 799

Engelhardt, W.A., L.L. Kisselev und R.G. Neuzlin (1970):

Das Prinzip des fixierten Partners als Werkzeug auf dem Gebiet der Molekularbiologie.

Mh Chemie 101, 1510

Engvall, E. and P. Perlmann (1971):

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry 8, 871

Engvall, E. and P. Perlmann (1972):

Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immun. 109, 129

Engvall, E., K. Jonsson and P. Perlmann (1971):

Enzyme-linked Immunosorbent Assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.

Biochim. Biophys. Acta 251, 427

Enoch, Ch. (1967):

Zur biologischen Differenzierung von hocherhitzen Fleischarten. Vergleichende Untersuchungen mittels Agar-Gel-Diffusion, Immunelektrophorese und indirekter Hämagglutination.

Diss. med. vet., München

Fischer, K.-H. und H.-D. Belitz (1971):

Elektrophoretischer Nachweis von Soja-Eiweiß in Fleischerzeugnissen.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 145, 271

Fischer, K.-H. und H.-D. Belitz (1976):

Untersuchungen zum Nachweis von Sojaeiweiß in Fleischerzeugnissen. Isolierung einer charakteristischen Proteinbande.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 162, 231

Fischer, K.-H., H.-D. Belitz und G. Kloos (1976):

Untersuchungen zum Nachweis von Sojaeiweiß in Fleischerzeugnissen. Nachweis von Canavanin.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 162, 227

Flint, F.O. and M.V. Meech (1978):

Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique.

Analyst 103, 252

Freed, J.H. and L.A. Herzenberg (1975):

Quantitative separation of antigen-specific murine antibodies by anti-allotype chromatography.

Scand. J. Immunol. 4, 479

Grabar, P. et C.A. Williams (1953):

Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 10, 192

Günther, H. (1969):

Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 97 und 128

Guy, R.C.E., R. Jayaram and C.J. Willcox (1973):

Analysis of commercial soya additives in meat products.
J. Sci. Fd. Agric. 24, 1551

Hähnel, W.Ch. (1984):

Zum Nachweis von Sojaprotein in Milchprodukten.
Diss. med. vet., München

Hassold, G. (1983):

Persönl. Mitteilung an Dr. Ring

Have, P. (1982):

Detection of canine parvovirus in fecal samples by ELISA.
Application to routine screenings and a comparison with
hemagglutination.

In: **Wardley, R.C., J.R. Crowther** (ed.): The ELISA: Enzyme-
linked Immunosorbent Assay in veterinary research and
diagnosis.

Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 124

Hayward, R.J. and R. Augustin (1957):

Quantitative geldiffusion methods for assay of antigens and
antibodies.

Int. Arch. Allergy 11, 192

Heinert, H.H. und H.-J. Baumann (1984):

Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst. PoroPAGE unter Zusatz
von SDS und Harnstoff.

Fleischwirtsch. 64, 89

Heinert, H.H. und H.-J. Baumannn (1986):

Nachweis von erhitztem Soja-Protein in Brühwurst durch
Elektro-Blotting (Glykoprotein-Blotting).

Fleischwirtsch. 66, 581

Herrmann, Ch. und L. Kotter (1968):

Serologische Verfahren bei der Überwachung von Fleischerzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 265

Herrmann, Ch., J. den Hartog und H. Thoma (1975):

Wie sicher ist der serologische Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen?

Fleischwirtsch. 55, 808

Herrmann, Ch., Ch. Merkle und L. Kotter (1973):

Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen für Fremdeiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen. 1. Mitt.: Präzipitationsreaktionen.

Fleischwirtsch. 53, 97

Herrmann, Ch., Ch. Merkle und L. Kotter (1973):

Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen für Fremdeiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen. 2. Mitt.: Agglutinationsreaktionen.

Fleischwirtsch. 53, 249

Hitchcock, Ch.H.S., F.J. Bailey, A.A. Crimes, D.A.G. Dean and P.J. Davis (1981):

Determination of soya proteins in food using an Enzyme-linked Immunosorbent Assay procedure.

J. Sci. Fd. Agric. 32, 157

Hjerten, S. (1962):

Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions.

Arch. Biochem. Biophys. 99, 466

Hofmann, K. und J.F. Penny (1971):

Identifizierung von Sojaprotein und Fleischiweiß mittels Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Fleischwirtsch. 51, 577

Hofmann, K. und J.F. Penny (1973):

Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf Flachgelen.

Fleischwirtsch. 53, 252

Horan, F.E. (1974):

Soy protein products and their production.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 51, 67A

Howard, C.J., R.N. Gourlay, L.H. Thomas and J. Eynon (1982):

Antibodies, by ELISA, to mycoplasmas in bovine sera.

In: **Wardley, R.C., J.R. Crowther (ed.):** The ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay in veterinary research and diagnosis.

Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 90

Humphrey, J.H. und R.G. White (1971):

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.

3. Auflage, Verlag Thieme, Stuttgart

Jul, M. (1979):

Vegetable proteins in meat products, problems and possibilities.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 56, 313

Kaiser, K.-P. und J. Krause (1985):

Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 180, 181

Kanout, A. und H. Mathois (1986):

Erhöhung der Spezifität des Immundiffusionstestes bei der Identifizierung vom Fleisch nahverwandter Tierarten.

Wien. tierärztl. Mschr. 73, 134

Kinsella, J.E. (1979):

Functional properties of soy proteins.

J. Am Oil Chemists'Soc. 56, 242

Kluge-Wilm, R. (1967):

Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hochehitzten Fleischwaren.

Diss. med. vet., Berlin

Kotter, L. und Ch. Herrmann (1968):

Die indirekte Hämagglutination als Nachweis für Fremdeiweiße.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 267

Kotter, L., Ch. Herrmann und G. Corsico (1966):

Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hochehitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

Z. Lebensm.-Unters. 133, 15

Kotter, L., A. Palitzsch und Ch. Herrmann (1968):

Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Fleischwarenverarbeitung.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 261

Kotter, L., H. Schulze und Ch. Herrmann (1968):

Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Fremdeiweißzusätzen zu Fleischerzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 263

Kristiansen, T. (1978):

Matrix-bound antigens and antibodies.

In: Hoffmann-Ostenhof, O., M. Breitenbach, F. Koller, D. Kraft and O. Scheiner (ed.): Affinity Chromatography, Pergamon Press, Oxford, p. 191

Krüger, H. und D. Großklaus (1971):

Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen. II. Mitt.: Untersuchungen mit Hilfe der Indirekten Hämagglutination und der Immunelektrophorese.

Fleischwirtsch. 51, 181

Krüger, H. und D. Großklaus (1971):

Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen. III. Mitt.: Untersuchungen mit Hilfe der quantitativen Präzipitattmessung.

Fleischwirtsch. 51, 315

Lee, Y.B., D.A. Rickansrud, E.C. Hagberg and E.J. Briskey (1975):

Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends.

J. Fd. Sci. 40, 380

Lee, Y.B., D.A. Rickansrud, E.C. Hagberg and R.H. Forsythe (1976):

Detection of various nonmeat extenders in meat products.

J. Fd. Sci. 41, 589

Levinson, A.A. and J.F. Lemancik (1974):

Soy protein products in other foods.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 51, 135A

Lindqvist, B., J. Östgren and J. Lindberg (1975):

A method for the identification and quantitative investigation of denatured proteins in mixtures based on computer comparison of amino-acid patterns.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 159, 15

Linke, H. (1969):

Histologischer Nachweis von "TVP".

Fleischwirtsch. 49, 469

Linke, H. (1983):

Auswirkungen des neuen Lebensmittelkennzeichnungsrechts auf das Reinheitsgebot bei Fleischwaren.

Fleischwirtsch. 63, 180

Llewellyn, J.W. (1982):

Analysis of novel proteins in meat products.

In: Hudson, B.J.F. (ed.): Developments in food proteins, Vol. 1, p. 171

Applied Science Publishers, London

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951):

Protein measurement with the phenol reagent.

J. biol. Chem. 193, 265

Märtlbauer, E. und G. Terplan (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver.

Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53

Mansfeld, R. (1986):

Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen).

2. Auflage, p. 545

Springer-Verlag, Berlin

Manz, J. (1979):

Serologische Untersuchungen an Extrakten aus Muskulatur von Rind, Schaf, Ziege und Reh.

Fleischwirtsch. 59, 408

Manz, J. (1983):

Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine mittels ELISA.

Bestimmung von Muskelproteinen vom Känguruh.

Fleischwirtsch. 63, 1767

Manz, J. (1985):

Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine mittels ELISA.

Bestimmung von Muskelproteinen von Rind und Schwein.

Fleischwirtsch. 65, 497

Menzel, E.J. (1981):

Biochemische Grundlagen der Bestimmung von Sojaprotein mit immunologischen Methoden.

Z. Ernährungswiss. 20, 55

Menzel, E.J. und F. Glatz (1981):

Die radioimmunologische Bestimmung von nativem und hitzedenaturiertem Sojaprotein.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 172, 12

Menzel, J.E. und H. Hagemeister (1982):

Solid-Phase-Radioimmunoassay for native and formaldehyde-treated soya protein.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 175, 211

Merkl, H. (1976):

Differenzierungsmöglichkeiten von Sojaprotein und Senfmehl.

Fleischwirtsch. 56, 1458

Miermeister, A. (1942):

Nachweis und Bestimmung von Sojamehl in Wurstwaren.

Z. Lebensm.-Unters. 84, 392

Mohr, P. and K. Pommerening (1985):

Affinity Chromatography. Practical and theoretical aspects.
Marcel Dekker, New York

N. N. (1982):

Neufassung der Fleisch-Verordnung vom 21.1.1982.
Bundesgesetzbl.I, 89

N. N. (1987):

FAO monthly bulletin of statistics 10, 19

Nowacki, J.A. (1979):

Retorted meat and vegetable protein combinations.
J. Am. Oil Chemists'Soc. 56, 328

Ohren, J.A. (1981)

Process and product characteristics for soy concentrates and isolates.
J. Am. Oil Chemists'Soc. 58, 333

Olsman, W.J. (1969):

Elektrophoretischer Nachweis von fleischfremden Eiweißen in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 141, 253

Olsman, W.J. (1979):

Methods for detection and determination of vegetable proteins in meat products.
J. Am. Oil Chemists'Soc. 56, 285

Olsman, W.J. and C. Hitchcock (1980):

Detection and determination of vegetable proteins in meat products.
In: King, R.D. (ed.): Developments in food analysis techniques, Vol. 2, p. 225
Applied Science Publishers, London

Olsman, W.J. and B. Krol (1978):

Methods for detection and determination of vegetable proteins in meat products.

In: Report of the study group on vegetable proteins in foodstuffs for human consumption in particular in meat products.

EUR 6026 Commission of the European Communities, Luxembourg, p. 112

Olsman, W.J., S. Dobbelaere and Ch.H.S. Hitchcock (1983):

The performance of an SDS-PAGE and an ELISA method for the quantitative analysis of soya protein in meat products.

A collaborative study, Zeist

Ouchterlony, Ö. (1958):

Diffusion in gel-methods for immunological analysis. I.

Progr. Allergy 5, 1

Ouchterlony, Ö. (1962):

Diffusion in gel-methods for immunological analysis. II.

Progr. Allergy 6, 30

Oudin, J. (1949):

La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues.

Etude quantitative des trois principales variables.

Comptes rend. Acad. Sci. 228, 1890

Parisi, E., A. Maranelli and A. Giordano (1974):

Histological detection of soy proteins in cooked meat products.

Vet. ital. 25, 384

Parsons, A.L. and R.A. Lawrie (1972):

Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products.

J. Food Technol. 7, 455

Porath, J. and P. Flodin (1959):

Gel filtration: A method for desalting and group separation.
Nature 183, 1657

Porath, J., R. Axen and S. Ernback (1967):

Chemical coupling of proteins to agarose.
Nature 215, 1491

Rakosky, J. Jr. (1970):

Soy products for the meat industry.
J. Agr. Fd. Chem. 18, 1005

Renz, V. und G. Terplan (1987):

Nachweis von Saxitoxin mittels ELISA.
28. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der
Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Garmisch-
Partenkirchen, p. 97

Ring, Ch. (1964):

Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes Eiweiß
mittels Metallverbindungen.
Diss. med. vet., München

Ring, Ch. (1985):

Zum Nachweis von Sojaproteinisolat in Brühwurst mittels
ELISA.
26. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der
Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Garmisch-
Partenkirchen, p. 273

Ring, Ch. (1987):

Quantitativer Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst. Nachweis
mittels ELISA.
Fleischwirtsch. 67, 203

Ring, Ch. (1988):

Persönl. Mitteilung

Ring, Ch. und F. Sacher (1984):

Quantitativer Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst.

Modifikation der Indirekten Hämagglutination.

Fleischwirtsch. 64, 355

Ring, Ch., P. Weigert und L. Hellmannsberger (1982):

Zur Differenzierung von Eiweiß pflanzlichen und tierischen

Ursprungs mittels Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.

Fleischwirtsch. 62, 648

Roider, R. (1984):

Zur Extraktion von Sojaprotein und aufgeschlossenen Milch-
eiweiß aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen.

Diss. med. vet., München

Rolle, M. und A. Mayr (1978):

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

4. Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart

**Saint-Blancard, J., M. Allary, P. Girot and E. Boschetti
(1983):**

Use of affinity chromatography for the purification of plasma
proteins.

In: Chaiken, J.M., M. Wilchek and I. Parikh (ed.): Affinity
chromatography and biological recognition, p. 463

Academic Press, Orlando

Scheidegger, J.J. (1955):

Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse.

Int. Arch. Allergy 7, 103

Schutte, L. (1979):

Comments on the report of the study group on vegetable
proteins for human consumption in particular meat products,
by the Commission of the European Communities (April 1978).

J. Am. Oil Chemists'Soc. 56, 237

Scouten, W.H. (1981):

Affinity Chromatography.

Wiley Interscience, New York

Simon, E. und G. Terplan (1977):

Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test.

Zbl. Vet. Med. B 24, 842

Sinell, H.-J. (1968):

Probleme bei der Speziesidentifizierung von Proteinen in Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 121

Starkenstein, E. (1910):

Biochem. Z. 24, 210

Zit. nach: **Mohr, P. and Pommerening, K.:** Affinity Chromatography. Practical and theoretical aspects.

Marcel Dekker, New York 1985

Stavitsky, A.B. (1957):

Micromethods for the studies of proteins and antibodies.

1. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutinationinhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells.

J. Immun. 78, 380

Vanderveen, J.E. (1981):

Considerations in development of regulation for new protein sources.

J. Am. Oil Chemists'Soc. 58, 429

Voller, A., D. Bidwell and A. Bartlett (1980):

Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

In: **Rose, N.R. and H. Friedmann (ed.):** Manual of clinical immunology. 2nd ed., p. 359

Am. Soc. Microbiol., Washington

Wagenstaller, G.Ch. (1972):

Nachweis von Sojaprotein in hocherhitzten Fleischerzeugnissen mit Hilfe der standardisierten indirekten Hämagglutinationsreaktion.

Diss. med. vet., München

Waggle, D.H., C.D. Decker and C.W. Kolar (1981):

Soya products in meat, poultry and seafood.

J. Am. Oil Chemist'Soc. 58, 341

Weemen, B.K. van and A.H.W.M. Schuurs (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.

FEBS-Letters 15, 232

Weiland, G. (1978):

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) als neue serodiagnostische Methode zum Nachweis von parasitären Infektionen.

Münch. med. Wschr. 120, 1457

Wiegmann, J. (1982):

Untersuchungen über die Einsatzmöglichkeiten des indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA, zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner.

Diss. med. vet., Berlin

Wilchek, M., T. Miron and J. Kohn (1984):

Affinity Chromatography.

Meth. Enzymol. 104, 3

Wolf, W.J. (1970):

Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties.

J. Agr. Fd. Chem. 18, 969

Wolf, W.J. (1972):
What is soy protein?
Fd. Technol. 25, 44

Herrn Prof. Dr.Dr.habil. Chr. Ring möchte ich danken für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung der Arbeit und deren kritische Durchsicht.

Herrn Prof. Dr. Jennissen danke ich für die wertvollen praktischen Ratschläge, die stets gewährte freundliche Unterstützung und die Durchsicht der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Fr. Rode und Fr. Botzet für die zahlreichen technischen Hilfeleistungen.

Fr. Zollner danke ich für die schnelle und zuverlässige Durchführung der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Geburtsdatum:	11. August 1961
Geburtsort:	Vohenstrauß
Eltern:	Anton Puff Rita Puff, geb. Frischholz
1967 - 1971	Volksschule Pleystein
1971 - 1980	Augustinus-Gymnasium Weiden
1980 - 1985	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
1986	Approbation als Tierarzt
Ab März 1986	Anfertigung der Disserta- tion am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tieri- schen Ursprungs

